

**Assimilation von
Glutamat, Aspartat und ihrer Amide
durch
Pseudomonaden**

DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ute Klöppner
aus
Gut Hohenhaus

Marburg/Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: .12.1999
Tag der mündlichen Prüfung: .12.1999
Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl
Zweitgutachter: Prof. Dr. K. H. Röhm

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. H. Röhm am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von März 1996 bis Dezember 1999 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. H. Röhm danke ich für die interessante Themenstellung, die immerwährende Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für das sehr gute Miteinander und den Spaß den wir bei der Arbeit hatten.

Bei Herrn Henseling möchte ich mich für seine Geduld und die Unterstützung bei den vielen HPLC-Messungen bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Uwe Völker und Sven, die die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese ermöglicht haben sowie Herrn Prof. Berger und Gert Häde für die ^{15}N -NMR-Messungen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Bettina, Ute, Uli, Anja und Stefan für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein ganz besonderer Dank gilt Uli, Anja, Bettina und meinen Eltern.

1	Einleitung.....	1
1.1	Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre	2
1.2	Mechanismen der Wachstumsförderung durch Biokontrollorganismen	4
1.3	Pseudomonaden - nützliche Bodenbakterien für die Biokontrolle	6
1.4	Faktoren für eine effiziente Besiedlung der Rhizosphäre.....	7
1.5	Aminosäuren in Wurzelexsudaten	8
1.6	Stickstoffassimilation durch Pseudomonaden	9
1.7	Bakterielle Amidasen und Aspartasen	12
1.8	Katabolitrepression in Pseudomonaden	13
1.9	Zielsetzung	14
2	Material.....	15
2.1	Geräte	15
2.2	Chemikalien und Enzyme	16
2.3	Medien	16
2.3.1	Minimalmedium zur Aufzucht von <i>Pseudomonas</i>	16
2.3.2	Vollmedium zur Aufzucht von <i>Pseudomonas</i>	17
2.3.3	Luria-Bertani-Medium (LB-Medium).....	17
2.3.4	Nährmedium für Pflanzen (Hoagland-Medium).....	17
2.3.5	Hefeagar für Pflanzenkeime.....	18
2.4	Mikroorganismen.....	18
2.5	Computersoftware.....	19
3	Methoden	20
3.1	Anzuchtbedingungen für Bakterienkulturen.....	20
3.2	Stammhaltung	20
3.3	Aktivitätsbestimmung der Asparaginase/Glutaminase	20
3.3.1	Bestimmung der Aktivität mittels gekoppeltem Enzymtest.....	20
3.3.2	Bestimmung der Aktivität mit L-Asparaginsäure- β -Hydroxamat (AHA) ..	21
3.4	Aktivitätsbestimmung der Enzyme des N-Stoffwechsels.....	23
3.4.1	Herstellung von Gesamtzellprotein-Extrakten.....	23
3.4.2	Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenase (GDH).....	23
3.4.3	Aktivitätsbestimmung der Glutamin-Synthetase (GS).....	24
3.4.4	Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Synthase (GOGAT).....	25
3.4.5	Aktivitätsbestimmung der Aspartase	25
3.5	Proteinbestimmung	26
3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.7	Proteinfärbung mit Coomassie Blue	27

3.8	Silberfärbung.....	28
3.9	Zweidimensionale Proteingelelektrophorese	28
3.9.1	Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten.....	28
3.9.2	Durchführung der 2D-Proteingelelektrophorese.....	29
3.9.3	Silberfärbung.....	32
3.10	N-terminale Proteinsequenzierung.....	33
3.11	Isolierung der Asparaginasen aus <i>P. fluorescens</i>	34
3.11.1	Zellfraktionierung.....	34
3.11.2	Chromatofokussierung	35
3.11.3	Anionenaustausch-Chromatographie mit MonoQ	35
3.12	Analyse von Wurzelexsudaten.....	36
3.12.1	Anzucht von Pflanzenkeimlingen aus Weizen-, Reis- und Gerstesamen ...	36
3.12.2	Aufarbeitung der Wurzelexsudate.....	37
3.12.3	Aminosäureanalyse der Wurzelexsudate mittels HPLC	38
3.13	Detektion der Metabolite von $^{15}\text{NH}_4^+$ und $^{15}\text{NH}_2\text{R}$ aus Glutamat mittels NMR-Spektroskopie	39
3.14	Konzentrationsbestimmung von NH_3 , Asparagin und Aspartat im Medienüberstand.....	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Allgemeine Vorbemerkung.....	41
4.2	Verwertung von Aminosäuren als Stickstoffquelle	41
4.2.1	Wachstum auf Aminosäuren als Stickstoffquelle	41
4.2.2	Enzyme des N-Stoffwechsels der Bakterien <i>P. fluorescens</i> (WT) und <i>P.</i> <i>putida</i> (WT).....	43
4.2.3	Nachweis von Metaboliten des N-Stoffwechsels mittels ^{15}N -NMR- Spektroskopie.....	44
4.3	Verwertung von Asparagin durch <i>P. putida</i> (WT) und <i>P. fluorescens</i> (WT).....	47
4.3.1	Asparagin als N-Quelle	47
4.3.2	Asparagin als C-Quelle	48
4.4	Verwertung der Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat durch verschiedene <i>Pseudomonas</i> -Stämme – beteiligte Enzyme und deren Eigenschaften	49
4.4.1	Aktivität einer Aspartase des Bakteriums <i>P. fluorescens</i> (WT).....	49
4.4.2	Aktivität und Lokalisation der Asparaginasen aus <i>P. fluorescens</i> (WT)	49
4.4.2.1	Aktivität der periplasmatischen Asparaginase in Biokontrollstämmen und pflanzenpathogenen Stämmen im Vergleich.....	51
4.4.3	Auswirkung von C-Quellen auf die Aktivität der PfGA.....	52
4.4.3.1	Auswirkung von C-Quellen auf die Aktivität einer periplasmatischen Asparaginase in Biokontrollstämmen	54
4.4.4	Auswirkungen der Katalyseprodukte Aspartat und Glutamat auf die Aktivität der PfGA	55
4.4.5	Untersuchungen zur Aufnahmegeschwindigkeit von Aspartat/Glutamat durch <i>Pseudomonas fluorescens</i> (WT)	56
4.4.6	Reinigung der PfGA.....	58

4.5	Analyse von differentiell exprimierten Proteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese	62
4.5.1	Differentielle Expression von Proteinen des Bakteriums <i>P. fluorescens</i> (WT) bei Wachstum auf den Medien M9-Asn und M9-Glc/NH ₄ ⁺	62
4.5.2	Induktion und Repression der PfGA unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	64
4.5.3	σ^{54} -abhängige Induktion von Proteinen des Bakteriums <i>P. putida</i> KT2440 ...	65
4.6	Analyse von Wurzelexsudaten.....	69
5	Diskussion	74
5.1	Die Verwertung von Aminosäuren als Stickstoffquelle	74
5.2	Asn – Bedeutung als N- oder C-Quelle?.....	78
5.2.1	Identifizierung und Charakterisierung der Asparaginasen aus <i>P. fluorescens</i> (WT)	80
5.3	Der Einfluß von C-Quellen auf die PfGA und PfA	83
5.4	Untersuchung der periplasmatische Asparaginase in Biokontrollstämmen.....	84
5.5	Die Verwertung von Aspartat durch <i>P. fluorescens</i> (WT).....	85
5.6	Differentiell exprimierte Proteine des Bakteriums <i>P. fluorescens</i> und des Bakteriums <i>P. putida</i> KT2440	87
5.7	Analyse von Aminosäuren in Wurzelexsudaten	89
5.8	Fazit und Ausblick	91
6	Zusammenfassung.....	93
7	Abkürzungsverzeichnis	94
8	Literatur.....	96

1 EINLEITUNG

Der Anbau von Kulturpflanzen spielt für die Versorgung der Menschheit mit Nahrungsmitteln eine entscheidende Rolle. Durch Düngemittel sowie den Einsatz von chemischen Pestiziden gegen Pflanzenkrankheiten und Schädlingsbefall konnten erhebliche Ertragssteigerungen erzielt werden. Seit einigen Jahren jedoch tritt das Problem der Umweltbelastung, das mit dem hohen Einsatz von Chemikalien verbunden ist, in das Bewußtsein. Bedingt durch großflächige Monokulturen wird die Verbreitung von Pflanzenschädlingen begünstigt und erfordert einen erhöhten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln. Die resultierende Verschmutzung von Trinkwasser, die Anreicherung von Xenobiotika in der Nahrungskette, sowie die Zerstörung empfindlicher Ökosysteme und deren Folgen führen zur Suche nach unbedenklicheren Alternativen.

Im Zusammenhang mit der biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten werden in der Literatur zunehmend Mikroorganismen der Rhizosphäre erwähnt [De Weger *et al.*, 1995; Tsuchiya, 1997; Wenhua, 1997; Werner *et al.*, 1997]. Diese als „Biokontrollorganismen“ und „Organismen zur Wachstumsförderung von Nutzpflanzen“ (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria [Glick, 1994]) bezeichneten Bodenbewohner verhindern Pflanzenkrankheiten und fördern das Pflanzenwachstum durch verschiedenste Mechanismen. Erwähnt seien dabei die Produktion von Antibiotika gegen pflanzenpathogene Bakterien oder Pilze, Produktion von wachstumsfördernden Substanzen sowie Induktion unspezifischer (systemischer) Resistenzen in der Pflanze [Mulya *et al.*, 1996].

Dennoch ist die Wechselwirkung zwischen Pflanzen und den Mikroorganismen des Bodens bis heute nahezu unerforscht. Man weiß nur wenig über die molekularen Grundlagen, die für die Wurzelbesiedlung und Rhizosphärenkompetenz wichtig sind. Ein Beispiel für die geringe Kenntnis über die Wachstumsbedingungen der Rhizosphärenbakterien ist die Tatsache, daß bisher nur 1-10 % dieser Bakterien auf Medien im Labor kultivierbar sind [Campbell *et al.*, 1990].

1.1 Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre

Ein bekanntes Beispiel für die Interaktion von Bakterien und Pflanzen ist die Symbiose von Leguminosen wie Bohnen, Klee und Lupinen mit Knöllchenbakterien (Rhizobien). Diese Bakterien können molekularen Stickstoff der Luft reduzieren und versorgen die Pflanze mit Stickstoff in Form von Ammoniumionen. Als Gegenleistung übernimmt die Pflanze die Ernährung der Symbionten. Die Ansiedlung der Rhizobien stellt dabei einen kontrollierten Prozeß dar. Die Wirtspflanze signalisiert die Bereitschaft zur Bildung von Knöllchen durch das Ausscheiden von Flavonoiden, die bakterielle *nod*-Gene aktivieren. Diese kodieren für Proteine, die an der Bildung von Wurzelknöllchen beteiligt sind [Heldt, 1997]. Die Assimilation von Stickstoff in oxidierter Form als Nitrat ist für die Pflanze der energetisch günstigere Weg. Deshalb tritt die Knöllchenbildung nur bei Stickstoffmangel im Boden auf. Der Vorteil dieser Symbiose liegt darin, daß Leguminosen auch auf extrem stickstoffarmen Böden wachsen können, auf denen andere Pflanzen keine Chance mehr haben [Heldt, 1997].

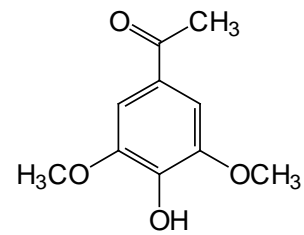
Die Anzahl von Mikroorganismen in der unmittelbaren Nähe der Pflanzenwurzel, der Rhizosphäre, ist deutlich höher als in entfernteren Bereichen des Bodens [Hiltner, 1904]. Durch die Abgabe von Substanzen über die Wurzel (Exsudation) bietet die Grenzschicht zwischen Wurzel und Boden ein erhöhtes Nährstoffangebot, das von Bakterien und Pilzen genutzt wird [Lynch und Whipps, 1990]. Aminosäuren, Zucker und organische Säuren bilden dabei den Hauptbestandteil der Exsudate [Whipps, 1990]. Die effiziente Nutzung dieser Nährstoffe ist für die Besiedlung der Rhizosphäre und damit das Überleben von Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung.

Die Freisetzung dieser Substanzen durch die Wurzel bewirkt einen von der Wurzeloberfläche in den Boden führenden Konzentrationsgradienten von Nährstoffen mit höchsten Konzentrationen im unmittelbaren Wurzelbereich. Verschiedene Komponenten der Wurzelexsudate wirken für Bakterien als chemische Lockstoffe.

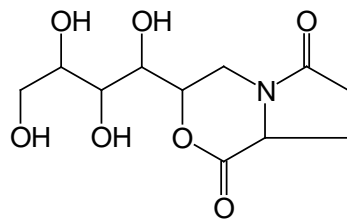
So besitzt z.B. das pflanzenpathogene Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* ein hochsensitives Chemotaxissystem, das auf eine Anzahl von Aminosäuren und Zuckern reagiert. Einige dieser Zucker wie Glucose, Fructose, Galactose und Xylose wurden als Induktoren der Virulenzgene (*vir*) dieses Bakteriums identifiziert [Cangelosi *et al.*, 1990]. Möglicherweise leiten bestimmte Stoffe, wie das Phenolderivat Acetosyringon, das ein Hauptinduktor der *vir*-Gene ist, das Bakterium schon in sehr niedrigen

Konzentrationen zu Pflanzenwunden. Erst dort werden durch höhere Induktorkonzentrationen weitere *vir*-Gene aktiviert [Van de Broek und Vanderleyden, 1995].

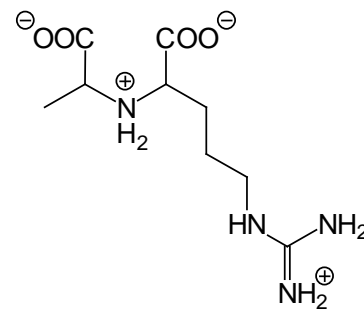
In diesem Fall ist der Nutzen aber einseitig: *A. tumefaciens* löst an Verwundungsstellen der Pflanze Tumorwachstum aus, indem es die Pflanzenzelle veranlaßt, die Phytohormone Auxin und Cytokinin zu produzieren. Diese bewirken ein ungezügelteres Wachstum in diesem Bereich, was zur Ausbildung von sogenannten Wurzelhalsgallen führt. In diesen wird aus verschiedenen Metaboliten der Pflanze, wie Zuckern und Aminosäuren, eine Vielfalt von Kondensationsprodukten, sogenannten Opinen gebildet, die von den Wurzelhalsgallen ausgeschieden werden und aufgrund ihrer chemischen Stabilität nur von *A. tumefaciens*, nicht aber von anderen Bodenbakterien verwertet werden können [Heldt, 1997].



Acetosyringon



Agropin



Octopin

Opine

Biokontrollorganismen sowie pflanzenwachstumsfördernde Bakterien, wie verschiedene *Pseudomonas*-Stämme, zeigen deutliche Reaktionen auf Exsudat-Komponenten. So wurde das *aggA*-Gen, das bei *Pseudomonas putida*, das für Agglutination und eine Bindung an die Wurzel kodiert, durch verschiedene Substanzen, die exsudatspezifisch sind, induziert [Buell und Anderson, 1993]. Verschiedene Mutanten von *P. fluorescens* zeigten Reporterogenaktivitäten bei *lacZ*-Fusionen unter Zugabe von Wurzelexsudaten des Weizens, aber auch gegenüber einzelnen Komponenten der Exsudate, wie verschiedenen Aminosäuren [Van Overbeek *et al.*, 1994].

Insgesamt scheint der Nutzen des hohen Nährstoffangebotes in der Rhizosphäre nicht allein auf der Seite der Mikroorganismen zu liegen. Es wurde abgeschätzt, daß Pflanzen

die unter gnotobiotischen Bedingungen wachsen, im Vergleich zu Pflanzen die von Mikroorganismen besiedelt werden, nur etwa die Hälfte an Kohlenstoffkomponenten über die Wurzel abgeben [Barber und Martin, 1976]. Anscheinend hat die Zusammensetzung der Exsudate einen gewissen Einfluß darauf, welche Bakterienpopulationen sich in der Rhizosphäre ansiedeln können [Latour *et al.*, 1996]. Es steht die Frage offen, ob Pflanzen sogar gezielt in der Lage sind, Bedingungen in der Rhizosphäre zu schaffen, die die Ansiedlung von nützlichen Mikroorganismen fördern.

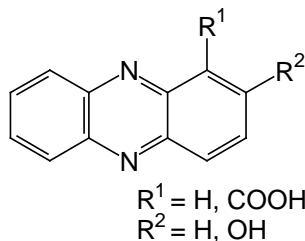
1.2 Mechanismen der Wachstumsförderung durch Biokontrollorganismen

Es existiert eine Vielzahl von Mikroorganismen, die in Gewächshauskulturen und Feldversuchen das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen. Hierzu gehören die schon in Kap. 1.1 erwähnten Rhizobien, die Leguminosen bei N-Mangel im Boden mit Stickstoff versorgen können.

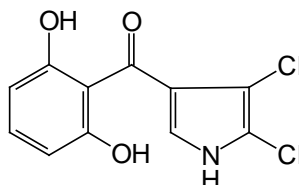
Eine große Zahl von Bodenpilzen ist in der Lage in die Pflanzenwurzel einzudringen und durch Auxinbildung verstärktes Wurzelwachstum anzuregen. Durch eine enge Vergesellschaftung der Wurzel mit diesen Pilzen (Mycorrhiza) wird der Pflanze eine effektive Versorgung mit Mineralstoffen, wie z.B. Phosphat und gebundenem Stickstoff, aus dem Boden gewährleistet [Read, 1991]. Weitere Mikroorganismen produzieren pflanzliche Wachstumshormone, wie Ethylen, Gibberelline, Auxine und Cytokinine, und können so das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen [Lynch, 1983]. Beobachtet wurde dieser Effekt u. a. bei Bakterien wie *Azospirillum* (Reis, Gerste und Weizen), *Klebsiella* (Reis, Süßkartoffeln), *Achromobacter* (Reis) [Lengeler *et al.*, 1999].

Nicht immer beruht die fördernde Wirkung auf direkten Einflüssen wie der Bereitstellung von Nährstoffen. Eine Reihe von Bakterien produziert z.B. Antibiotika, die gezielt gegen pathogene Bakterien und Pilze wirken.

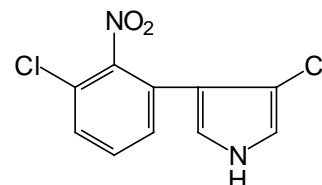
Verschiedene Verbindungen, wie Phenazine, Pyoluteorin, Pyrrolnitrin, Tropolon und 2,4-Diacetylphloroglucinol, konnten isoliert und mit der Suppression von pflanzenpathogenen Organismen in Verbindung gebracht werden [O'Sullivan und O'Gara, 1992].



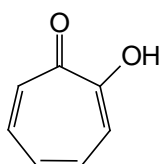
Phenazine



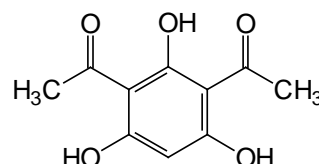
Pyoluteorin



Pyrrolnitrin



Tropolon



2,4-Diacetylphloroglucinol

Die Wirksamkeit des von *P. fluorescens* produzierten Antibiotikums Phenazin gegen den Wurzelschädling *Gaeumannomyces graminis* konnten Thomashow und Weller [1988] durch eine Phenazin-defiziente Mutante nachweisen. Im Gegensatz zum Wildtyp fehlte der Mutante die Fähigkeit, Weizen vor einer Schädigung durch *G. graminis* zu schützen. Es konnte in Wurzelexsudaten mittels HPLC-Analysen nur dann Phenazin nachgewiesen werden, wenn diese vom Wildtyp besiedelt wurden, nicht aber bei einer Besiedlung mit der Phenazin-defizienten Mutante [Thomashow *et al.*, 1990]. Diese Versuche waren der erste unmittelbare Beweis für die gezielte Wirksamkeit eines von Bakterien produzierten Antibiotikums gegen einen Pflanzenschädling.

Die Expression von Genen, die an der Produktion von Antibiotika beteiligt sind, unterliegen komplexen Regulationsmechanismen. Wesentlichen Einfluß haben hierbei physiologische Bedingungen der Zelle, wie Wachstumsphase, äußerer Streß und Nährstoffangebot [Thomashow und Mavrodi, 1997]. Die Konzentration von Oomycin, einem von *P. fluorescens* Hv37a hergestellten Antibiotikum, steigt in Anwesenheit von Glucose auf eine fast 200-fache Konzentration an [James und Gutterson, 1986].

Andere Bakterien, darunter verschiedene fluoreszierende Pseudomonaden, setzen HCN frei und beeinflussen Wurzelpathogene auf diese Weise. Voishard *et al.* konnten zeigen, daß eine HCN-defiziente Mutante von *P. fluorescens* CHAO ihre Wirksamkeit

gegen Schwarzwurzelfäule bei Tabakpflanzen verloren hatte. Der Wirkungsmechanismus von HCN ist bisher nicht geklärt. Eine Vermutung besteht darin, daß es die Bildung von Wurzelhaaren der Pflanze fördert und sie dadurch resistenter gegen Angriffe von Pflanzenschädlingen wird [Voisard *et al.*, 1989].

Einige nichtpathogene Mikroorganismen scheinen bei ihrem Wirt unspezifische Resistenzen auszulösen, die unter der Bezeichnung induzierte oder systemische Resistenz bekannt sind [Tsuchiya, 1997]. Hinweise darauf lieferte die Beobachtung, daß einige Stämme erst in Feldversuchen Abwehrreaktionen hervorriefen, während *in vitro* kein Einfluß auf den Schädling, hier *Pythium*, erkennbar war [Kloepper *et al.*, 1991; Lifshitz *et al.*, 1987].

Eine weitere Möglichkeit, mit der Rhizobakterien Pflanzen auf indirekte Weise vor schädlichen Mikroorganismen schützen können, ist eine hohe Rhizosphärenkompetenz. Sie besteht in der Fähigkeit, Wurzeln schnell zu besiedeln und auch geringe Nährstoffangebote effizient zu nutzen. Weniger aggressive Besiedler, darunter verschiedene schädliche Pilze, werden verdrängt [De Leij *et al.*, 1995; Paulitz 1991].

Die Versorgung mit Eisen ist hierfür ein Beispiel. Eisen ist ein wichtiges Element für das bakterielle Wachstum. Dennoch ist es, insbesondere in sauerstoffreichen Böden nicht in ausreichender Menge verfügbar. Im Vergleich zu anaeroben Bedingungen in denen vorwiegend Fe^{2+} -Ionen vorliegen, entstehen unter aeroben Bedingungen nahezu unlösliche Eisen(III)hydroxid-Komplexe. Viele Mikroorganismen scheiden Substanzen aus, die Fe^{3+} -Ionen löslich machen indem sie sie komplex binden und so transportieren können. Solche Substanzen werden als Siderophore bezeichnet. Auch fluoreszierende Pseudomonaden, die zu den wachstumsfördernden Bakteriestämmen zählen, können solche Siderophore ausbilden [Loper und Buyer, 1991; Kloepper *et al.*, 1980].

1.3 Pseudomonaden - nützliche Bodenbakterien für die Biokontrolle

Bakterien der Gattung *Pseudomonas* sind Gram-negative, polar begeißelte Stäbchen. Sie bilden keine Sporen und wachsen aerob. Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe Atmung, bei einigen Arten auch durch anaerobe Atmung (Denitrifikation, Nitratatmung). Sie können eine große Zahl organischer Substanzen verwerten, darunter heterocyclische und aromatische Verbindungen. Zucker werden im allgemeinen über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut. Aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit sind *Pseudomonaden* überall anzutreffen, so in Boden, Wasser, Abwasser und Luft. Typisch ist die Bildung wasserlöslicher fluoreszierender Pigmente wie z.B. dem blau-grün fluoreszierenden Phenazinderivat Pyocyanin.

Bekannte *Pseudomonas*-Arten sind *P. aeruginosa*, ein pathogenes Bakterium, das Menschen und Tiere befällt und u.a. Wundinfektionen hervorruft. Viele für Pflanzen pathogene Stämme werden unter der Art *P. syringae* zusammengefaßt [Schlegel, 1992].

In Bezug auf wachstumsfördernde Eigenschaften werden in der Literatur häufig die beiden Arten *P. fluorescens* und *P. putida* erwähnt. Sie gehören zu den häufigsten Rhizosphärenbewohnern von Nutzpflanzen [Kleeberger *et al.*, 1983] und zählen zu den vielversprechendsten Kandidaten bei der Kontrolle von schädlichen Bodenmikroorganismen [Tsuchiya, 1997]. Aus diesem Grund beziehen sich die folgenden Kapitel hauptsächlich auf diese Bakterien.

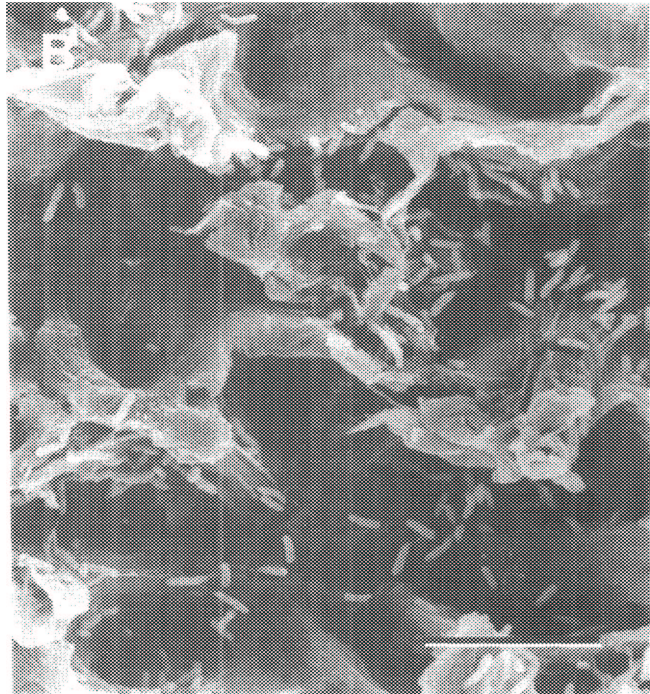


Abb. 1: Bakterien der Gattung *P. fluorescens* einer Tomatenwurzel. Länge des Balkens: 10 µm [Chin-A-Woeng, 1997]

1.4 Faktoren für eine effiziente Besiedlung der Rhizosphäre

Der Nutzen von Biokontrollstämmen hängt wesentlich davon ab, ob diese die Wurzeloberfläche ihres Wirtes erfolgreich und dauerhaft besiedeln und mit anderen Mikroorganismen konkurrieren können. Wichtige Faktoren hierfür sind:

- 1.) Eine gute Anpassung an das gegebene Nährstoffangebot und dessen effiziente Verwertung.

Ein Beispiel für eine effiziente Nutzung eines sonst wachstumslimitierenden Nährstoffes durch Pseudomonaden ist die schon in Kapitel 1.2 (S. 4) genannte Siderophorenbildung zur Versorgung mit Eisen. Kenntnisse darüber, ob diese Bakterien z.B. bestimmte Exsudatkomponenten besonders gut nutzen können, gibt es bisher nicht. Einzige Hinweise auf ein „Erkennen“ sowie die „Reaktion“ auf bestimmte Substanzen aus Exsudaten wurden über die Bestimmung von Reportergenaktivitäten erzielt [Van Overbeek, 1994].

2.) Schnelles Wachstum sowie ausreichende Mobilität, um zu Orten mit hohen Nährstoffkonzentrationen zu gelangen.

Um Orte hoher Nährstoffkonzentration zu erreichen, wird die Fähigkeit zur Chemotaxis oder das Anhaften an die Pflanzenwurzel vermutet [Van de Broek und Vanderleyden, 1995]. Durch Untersuchungen mit genetisch veränderten Bakterien wurde das zum Teil bestätigt. Eine Mutante von *P. fluorescens*, der die Eigenschaft zur Flagellinbildung fehlte, war nicht mehr in der Lage, tiefere Wurzelbereiche der Kartoffel zu besiedeln [De Weger *et al.*, 1987].

3.) Schutzmechanismen gegen Nährstoffkonkurrenten und äußere Streßfaktoren.

Die Synthese von Antibiotika durch Pseudomonaden wurde schon als Beispiel für den Schutz gegen Nährstoffkonkurrenten erwähnt. Ein Schutz gegen äußere Streßfaktoren ist z.B. die bei *E. coli* gut untersuchte Synthese von Kälteschockproteinen als Reaktion auf tiefe Temperaturen [Carty *et al.*, 1999].

Wichtig scheint auch die Beschaffenheit der Bakterienoberfläche zu sein, wie zum Beispiel die Anwesenheit von O-antigenen Polysacchariden [De Weger *et al.*, 1989] sowie die Fähigkeit zur Synthese verschiedener Aminosäuren [Simons *et al.*, 1997].

Obwohl eine erfolgreiche Besiedlung der Wurzel so wichtig ist, ist über die molekularen Mechanismen, die dieser Fähigkeit zugrunde liegen, sehr wenig bekannt. Eindeutige Aussagen lassen sich erst durch Feldversuche machen, bei denen die zu untersuchenden Bakterien sämtlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind.

Eine direkte Möglichkeit, Erkenntnisse über Vorgänge während der Wurzelbesiedlung zu gewinnen, ist die Untersuchung der Gene, die ausschließlich in der Rhizosphäre exprimiert werden. Hierfür gibt es inzwischen eine Reihe von Reportergenen wie z.B. *lacZ*, *lux*, *gus* und *gfp*, die mit den Promotoren der zu untersuchenden Genen fusioniert werden können und damit Aussagen über die Genexpression erlauben [O'Sullivan und O'Gara, 1992; Bloemberg *et al.*, 1997].

1.5 Aminosäuren in Wurzelexsudaten

Pflanzen scheiden bis zu 40 % ihrer Photosyntheseprodukte über die Wurzel aus. Die Hauptbestandteile dieser pflanzlichen Exsudate sind Zucker, Aminosäuren, organische Säuren und in kleineren Mengen auch Fettsäuren, Nucleotide, Vitamine und Enzyme

[Lynch und Whipps, 1990]. Dabei hängen Menge und Zusammensetzung der Exsudate von der Pflanzenart, Bodenbeschaffenheit, Temperatur und verschiedenen weiteren Faktoren ab. Aber auch Rhizosphärenbakterien können, wie schon erwähnt, die Exsudation beeinflussen: die abgegebene Menge an Kohlenstoffkomponenten stieg bei einer Besiedlung mit Mikroorganismen deutlich an [Barber und Martin, 1976].

Es liegen verschiedene Analysen über die Zusammensetzung und Konzentrationen von Aminosäuren in Exsudaten vor. Im Hinblick darauf wurden Tomaten [Simons *et al.*, 1997], Hafer [Fan *et al.*, 1997], Reis [Lin und You, 1989], Raps [Shepherd und Davies, 1994] und Mais [Jones und Darrah, 1993] analysiert. Die Analysen zeigen, daß zwischen 30 und 50 % der in den Exsudaten enthaltenen Aminosäuren auf Aspartat und Glutamat sowie die entsprechenden Säureamide Asparagin und Glutamin entfielen.

Dennoch ist bis jetzt nicht geklärt, inwieweit Aminosäuren eine Rolle für die Nährstoffversorgung von Bakterien spielen. Es wurde vermutet, daß sie aufgrund ihres Stickstoffanteils möglicherweise eine Rolle bei der N-Versorgung einnehmen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß die stickstoffreichen Aminosäuren wie Asparagin, Glutamin, Arginin und Lysin von verschiedenen Rhizosphärenbakterien anscheinend besonders gut verwertet werden können [Shepherd und Davies, 1994; Odham *et al.*, 1986].

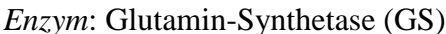
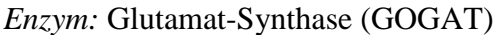
1.6 Stickstoffassimilation durch Pseudomonaden

Bakterien können eine Vielzahl von Stickstoffverbindungen wie z.B. N₂, Nitrat oder auch Aminosäuren für ihre Versorgung mit Stickstoff nutzen [Merrick und Edwards, 1995]. Dabei verläuft die Überführung von anorganischem Stickstoff in organische Verbindungen wie z. B. Aminosäuren immer über Ammonium-Ionen [Schlegel, 1992]. Ammonium-Ionen sind meist auch die bevorzugte Stickstoffquelle der Bakterien [Merrick und Edwards, 1995]. Hierbei existieren zwei assimilatorische Wege, deren Endprodukte Glutamin und Glutamat als Schlüsseldonatoren für Stickstoff dienen. Die Aminogruppe von Glutamat und Glutamin wird für die Herstellung weiterer Aminosäuren genutzt, die Amidgruppe von Glutamin dient der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Tryptophan, Histidin und NAD⁺ [Schreier, 1993]. Dies ist in dem folgenden Schema zusammengefaßt (Abb. 2):



α -KG: α -Ketoglutarat

Glutamin auf α -Ketoglutarat unter Bildung von zwei Molekülen Glutamat, wie (2) zeigt:



In Enterobakterien und stickstofffixierenden Bakterien wird Reaktion 1 bei hohen Ammoniumkonzentrationen im Medium beschritten, während das GS/GOGAT-System (2/3) bei niedriger Verfügbarkeit von Ammoniumionen aktiviert wird [Merrick und Edwards, 1995; Iaccarino *et al.*, 1990].

Auch Pseudomonaden können NH_4^+ -Ionen über diese beiden Wege assimilieren. Dabei ist die Regulation der daran beteiligten Enzyme aber noch nicht vollständig geklärt.

In *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* wurde das Vorhandensein von zwei verschiedenen Glutamat-Dehydrogenasen nachgewiesen. Das NADH-abhängige Enzym zeigt niedrige Aktivitäten in Glucose-Ammoniumsulfat-Medien und hohe Aktivitäten bei Wachstum auf Aminosäuren und Casaminosäuren. Die Funktion dieses Enzyms besteht in der Desaminierung von L-Aminosäuren zu den korrespondierenden α -Ketosäuren. Das zweite NADPH-abhängige Enzym zeigt den gegenteiligen Effekt, nämlich die höchste Aktivität auf Glucose-Ammoniumsulfat-Medium, und scheint damit eine Funktion bei der Assimilation von Ammoniumionen zu haben [Miyamoto und Katsuki, 1992].

Auch das GS/GOGAT-System ist in Pseudomonaden existent. Eine in *P. aeruginosa* nachgewiesene Glutamin-Synthetase wurde unter hohen NH_3 -Konzentrationen und limitierter C-Zufuhr reprimiert und bei geringem N-Angebot induziert [Janssen *et al.*, 1981]. Die Glutamin-Synthetase aus *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* und *P. putida* unterliegt einer posttranslationalen Modifikation durch Adenylierung, wobei das adenylierte Enzym die inaktive Form darstellt [Meyer und Stadtmann, 1981]. Die Glutamat-Synthase wurde in *P. aeruginosa* zwar nachgewiesen, ist in Pseudomonaden aber nicht weiter untersucht. Ihre Aktivität scheint nicht direkt mit dem Anteil an aktiver Glutamin-Synthetase zu korrelieren [Janssen *et al.*, 1981].

Stehen im Medium nicht genügend NH_4^+ -Ionen zur Verfügung, so müssen Enzyme aktiviert werden, die eine Versorgung mit Stickstoff auf anderem Weg sichern, wie z.B. durch den Abbau von Aminosäuren oder einer Vielzahl anderer Stickstoffverbindungen. Solche Enzyme unterstehen in Enterobakterien einem Stickstoffregulationssystem, dem Ntr-System. Dieses kontrolliert die Expression verschiedener Gene je nach Verfügbarkeit von N- und C-Quellen [Schreier, 1993].

Für Pseudomonaden ist ein solches System bisher nicht bekannt. Dennoch gibt es Hinweise auf Regulatorgene. Es deutet vieles darauf hin, daß Glutamin oder ein verwandter Metabolit eine Schlüsselstellung dabei einnimmt [Philipps, 1986].

1.7 Bakterielle Amidasen und Aspartasen

Unter den häufigsten Aminosäuren der Wurzelexsudate befinden sich Aspartat, Glutamat sowie deren entsprechende Säureamide. Eine Möglichkeit aus diesen Aminosäuren NH_4^+ -Ionen für die Versorgung mit Stickstoff freizusetzen ist deren Umsetzung durch Asparaginasen bzw. Glutaminasen oder durch Aspartase.

Asparaginasen wurden in zahlreichen Bakterien nachgewiesen [Huerta-Zepeda, 1996]. Sie besitzen häufig keine sehr hohe Substratspezifität und können meist sowohl Asparagin als auch Glutamin umsetzen. Auf der Suche nach Asparaginasen mit tumorhemmenden Eigenschaften wurde eine Glutaminase-Asparaginase aus dem *Pseudomonas*-Stamm 7A gereinigt und proteinchemisch sequenziert [Roberts, 1976]. Russische Arbeitsgruppen untersuchten an verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen Induktionsbedingungen des Enzyms und stellten Hypothesen darüber auf, ob möglicherweise verschiedene Asparaginasen/Glutaminasen in diesen Bakterien vorkommen [Nikolaev *et al.*, 1969; Nikolaev *et al.*, 1971].

Die weitere Umsetzung von Glutamat erfolgt meist durch oxidative Desaminierung oder Transaminierung [Philipps, 1986]. Aspartat kann durch eine Aspartase zu Fumarat und NH_4^+ umgesetzt werden. Diese Reaktion stellt eine direkte Verbindung zum Citrat-Zyklus her [Philipps, 1986]. Eine Aspartase des Bakteriums *P. fluorescens* wurde im Hinblick auf ihre Aktivität unter verschiedenen Induktionsbedingungen untersucht. Die Medien enthielten NH_4^+ und verschiedene C-Quellen wie Glucose, Malat, Succinat oder Aminosäuren als einzige N- und C-Quelle. Unter keiner dieser Bedingungen war eine wesentliche Induktion des Enzyms meßbar. Es wurde spekuliert, ob der Aspartase in diesem Bakterium sowohl eine Funktion bei der Desaminierung als auch der Aminierung zukommt [Miyamoto *et al.*, 1992]. In verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies kann Aspartat durch eine Aspartat- β -Decarboxylase in Alanin umgewandelt werden. In *P. dacunhae* wurden hohe Aktivitäten dieses Enzyms nachgewiesen [Shibatani *et al.*, 1979].

1.8 Katabolitrepression in Pseudomonaden

Während die Endprodukt-Repression die Synthese der Enzyme von Biosynthesewegen betrifft, reguliert die Katabolitrepression Abbauewege. Werden Bakterien zwei verschiedene Substrate in der Nährlösung angeboten, so wird in der Regel dasjenige vorgezogen, welches schnelleres Wachstum ermöglicht. Hierbei tritt das Phänomen der Diauxie auf: Die Expression von Genen, die für den Abbau der zweiten Substanz gebraucht werden, wird so lange reprimiert bis der bevorzugte Nährstoff zur Neige geht. Das Zellwachstum wird an dieser Stelle langsamer bis alle Enzyme zum Abbau des nun zu verwertenden Nährstoffes angeschaltet sind. Es zeigt sich eine zweite logarithmische Wachstumsphase. Diese Katabolit-Repressionskontrolle (CRC) ist für Enterobakterien gut untersucht. Für *E. coli* ist Glucose z.B. eine bevorzugte Kohlenstoffquelle. Durch den Transport von Glucose in die Zelle wird eine Phosphorylierungskaskade ausgelöst, die in einem verminderten cAMP-Spiegel resultiert. Damit verbunden ist die Repression eines Katabolit-Aktivator-Proteins (CAP) sowie eine Inaktivierung verschiedener Transportsysteme [Collier *et al.*, 1996].

Für Pseudomonaden ist über eine solche Katabolitrepression so gut wie nichts bekannt [Collier *et al.*, 1996]. *P. aeruginosa* zeigte in Medien die Glucose und eine weitere C-Quelle wie Acetat, Citrat, Succinat und Fumarat enthielten ebenfalls Diauxie [Hylemon und Phibbs, 1972; MacGregor *et al.*, 1992]. Wurde den Bakterien neben Glucose auch Pyruvat angeboten, so trat dieses Phänomen dagegen nicht auf und es wurde ein deutlich schnelleres Zellwachstum beobachtet als auf einer dieser C-Quellen alleine [Hylemon und Phibbs, 1972]. Dies deutet darauf hin, daß Glucose und Pyruvat möglicherweise gleichzeitig verwertet werden [Smyth und Clarke, 1975]. Bei Wachstum von *P. aeruginosa* auf verschiedenen Kohlenhydraten wie Glucose, Glycerol, Fructose oder Mannitol in Kombination mit organischen Säuren wie Citrat, α -Ketoglutarat, Succinat und Fumarat, werden letztere immer zuerst abgebaut [Wolff *et al.*, 1991]. Wurden Glucose und Succinat angeboten, so konnte auch eine Repression von zentralen Enzymen die am Hexoseabbau beteiligt sind, wie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase (KPDG) nachgewiesen werden [Siegel *et al.*, 1977].

In *P. putida* und *P. fluorescens* fand man ein Crc-Regulatorprotein [MacGregor *et al.*, 1996], über dessen chemische Aktivitäten bisher aber fast nichts bekannt ist [Collier *et al.*, 1996]. Müller *et al.* [1996] zeigten, daß Enzyme, die bei *P. putida* H am Phenolabbau beteiligt sind, durch das Operon *phlA*-L kodiert werden, das auf dem Plasmid pPGH1 liegt. Die Aktivierung des Operons untersteht einem σ^{54} -abhängigen

Promotor und wird durch das Genprodukt der *phl*-Gene, PhlR, positiv kontrolliert. Die Transkription der *phl*-Gene unterliegt dabei der Katabolitrepression durch Glucose und verschiedene organische Säuren (Succinat, Citrat). Diese Katabolitrepression scheint durch eine Negativkontrolle vermittelt zu werden, die den Aktivator PhlR hemmt [Müller *et al.*, 1996].

1.9 Zielsetzung

Pseudomonaden gehören zu den häufigsten Rhizosphärenbewohnern von Nutzpflanzen und sind vielversprechende Biokontrollorganismen. Es ist deshalb von Interesse, welche Eigenschaften die hohe Rhizosphärenkompetenz dieser Bakterien ausmachen. Ein wichtiger Faktor für die effiziente Besiedlung der Pflanzenwurzel ist eine gute Anpassung an das gegebene Nährstoffangebot und dessen Verwertung. Wurzelexsudate sind reich an Aminosäuren, wobei Aspartat und Glutamat sowie die entsprechenden Säureamide Asparagin und Glutamin einen hohen Anteil davon einnehmen.

In dieser Arbeit sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie Pseudomonaden diese vier Aminosäuren nutzen. Da Aminosäuren als N-Donatoren fungieren können und insbesondere Glutamin und Glutamat wichtige Intermediate des N-Stoffwechsels darstellen, sollten zunächst die Aktivitäten wichtiger Enzyme des N-Stoffwechsels wie Glutamin-Synthetase, Glutamat-Synthase, Glutamat-Dehydrogenase und Asparaginase bestimmt sowie der Verbrauch von N-Quellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer verfolgt werden. Hiermit sollten Hinweise auf bevorzugte N-Quellen erhalten werden.

Im Verlauf dieser Experimente zeigte sich, daß diese Aminosäuren von den Bakterien nicht nur als N-, sondern auch als alleinige C-Quelle genutzt werden können. Deshalb sollten weitere Untersuchungen Aufschluß darüber geben, welche Enzyme hierfür zum Abbau der Aminosäuren aktiviert und wodurch diese induziert oder reprimiert werden.

Desweiteren sollten die Exsudate verschiedener Getreidearten wie Weizen, Gerste und Reis auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersucht werden. Mit einem solchen System könnte dann im weiteren gezeigt werden, ob Bakterien z.B. die Exsudation von Nährstoffen stimulieren.

Ferner könnten durch Ausschalten der an der Aminosäureverwertung beteiligten Enzyme Hinweise darauf erhalten werden, ob die Bakterien durch die Verwertung dieser Aminosäuren möglicherweise einen Selektionsvorteil haben könnten.

Für die Untersuchungen wurden vorwiegend die beiden *Pseudomonas*-Spezies *P. fluorescens* und *P. putida* verwendet.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	Suprafuge 22	Heraeus, Osterode
Elektrophorese-Apparatur	Mini Protean-Cell, PAGE-Einheit	BioRad, München
Ultraschall-Gerät	Sonoplus GM 70	Bandelin, Berlin
Probenwechsler (HPLC)	Sampling Injector, 231 XL	Abimed, Langenfeld
pH-Meßgerät	Orion BSA 524	Orion, Colora, Lorch
HPLC	E 605	Waters, Eschborn
UV/VIS- Spektralphotometer	Spectrophotometer U2000	Hitachi, Tokio
Ammoniakelektrode	Model 95-12	Orion, Colora, Lorch
Mikrotiterplattenlesegerät	Reader 450	BioRad, München
Inkubationsschüttler	Novotron, AK 82	InforsAG, Bottmingen
FPLC	FPLC Protein Purification-Sytem E 604	Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler	Frac 100	Pharmacia, Freiburg
Power-Supply	Power-Supply 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Apparatur für Isoelektrische Fokussierung	MultiphorII Elektrophoresis unit	Pharmacia, Freiburg
Elektrophorese-Apparatur (2D-Gele)	Hoefer SE 600	Pharmacia, Freiburg

2.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Enzyme von den Firmen Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg), BioRad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Quiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

An speziellen Chemikalien und Verbrauchsmaterial wurden eingesetzt:

Säulenmaterial PBE-94	Pharmacia, Freiburg
Polybuffer 96	Pharmacia, Freiburg
Säulenmaterial AG50WX-8	BioRad, München

2.3 Medien

Die verwendeten Medien bzw. ihre Bestandteile wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Stammlösungen die nicht autoklavierbar waren, wurden durch einen Filter von 0,2 µm Porengröße (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem jeweiligen Medium 1,5 % Agar zugefügt.

2.3.1 Minimalmedium zur Aufzucht von *Pseudomonas*

M9-Medium

<u>200 mL Lösung A:</u>	5x M9-Salze: pH 7,4
	33,9 g Na ₂ HPO ₄
	15 g KH ₂ PO ₄
	2,5 g NaCl
	1 g NH ₄ Cl
	ad 1 L H ₂ O _{demin.}
<u>2 mL Lösung B:</u>	MgSO ₄ (1M)
<u>100 µL Lösung C:</u>	CaCl ₂ (1M)
<u>20 mL Lösung D:</u>	Glucose (20 %)
ad 1 L H ₂ O _{demin.}	

Die Lösungen A, B und C wurden autoklaviert, Lösung D wurde sterilfiltriert. Die Lösungen wurden dann in dem angegebenen Verhältnis gemischt.

Für die jeweiligen Versuche wurden die Stickstoff- und Kohlenstoffquelle in Konzentration und Zusammensetzung variiert.

2.3.2 Vollmedium zur Aufzucht von *Pseudomonas*

M1-Medium pH 7,0

5 g Pepton
 3 g Fleischextrakt
 ad 1 L H₂O_{demin.}

2.3.3 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g Bactotrypton
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 ad 1 L H₂O_{demin.}

2.3.4 Nährmedium für Pflanzen (Hoagland-Medium)

Die Komponenten wurden einzeln angesetzt und autoklaviert:

25 mL Salze A:

1,5 g KCl
 4 g CaCl₂
 ad 1 L dd H₂O

25 mL Salze B:

4 g MgSO₄ · 7 H₂O
 ad 1 L dd H₂O

5 mL SL-Medium:

200 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O
 300 mg MnSO₄ · H₂O
 20 mg ZnSO₄ · 7 H₂O
 10 mg CuSO₄ · 5 H₂O
 ad 1 L dd H₂O

5 mL KNO₃: 1 M

0,5 mL Fe-Citrat: 1,3 g / L

0,12 mL Kaliumphosphatpuffer:

0,2 g K₂HPO₄
 0,3 g KH₂PO₄
 ad 3 mL dd H₂O

ad 500 mL dd H₂O

2.3.5 Hefeagar für Pflanzenkeime

	2 g	Hefeextrakt
	2 g	Pepton
	15 g	Agar
ad	1 L	dd H ₂ O

2.4 Mikroorganismen

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *Pseudomonas*-Stämme

Mikroorganismen	Quelle
<i>P. putida</i> , Wildtyp (WT) (type strain ATCC 12633): ^T 291	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen (DSM)
<i>P. fluorescens</i> , Wildtyp (WT) (type strain ATCC 13525): ^T 50090	DSM
<i>P. fluorescens</i> W34	H. Buchenauer, Phytopathologie, Universität Hohenheim
<i>P. fluorescens</i> W24	H. Buchenauer, Phytopathologie, Universität Hohenheim
<i>P. putida</i> II 232	E. Koch, BBA Darmstadt
<i>P. chlororaphis</i> I 112	E. Koch, BBA Darmstadt
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> PG4180.N9	[Bender <i>et al.</i> , 1993]
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	M. Romantschuk, University of Helsinki, Finnland
<i>P. fluorescens</i> GSPB 1714	Göttinger Sammlung phytopathogener Bakterien (GSPB)
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	J.E. Loper, Oregon State University, USA
<i>P. putida</i> KT2440 Wildtyp (WT)	[Köhler <i>et al.</i> , 1989]
<i>P. putida</i> KT2440 (<i>rpoN</i>)	[Köhler <i>et al.</i> , 1989]

2.5 Computersoftware

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller/Anbieter
PeakFit (Peak separation and analysis software)	SPSS-Science, Chicago
MS Office	Microsoft, Redmont, USA
Sigma Plot 2.01	SPSS-Science, Chicago
MultAlin (Multiple sequence Alignment)	[Corpet, 1988]
PC-Kinetik-Collector	BioRad, München

3 METHODEN

3.1 Anzuchtbedingungen für Bakterienkulturen

Anzucht von *P. fluorescens* (WT) und *P. putida* (WT):

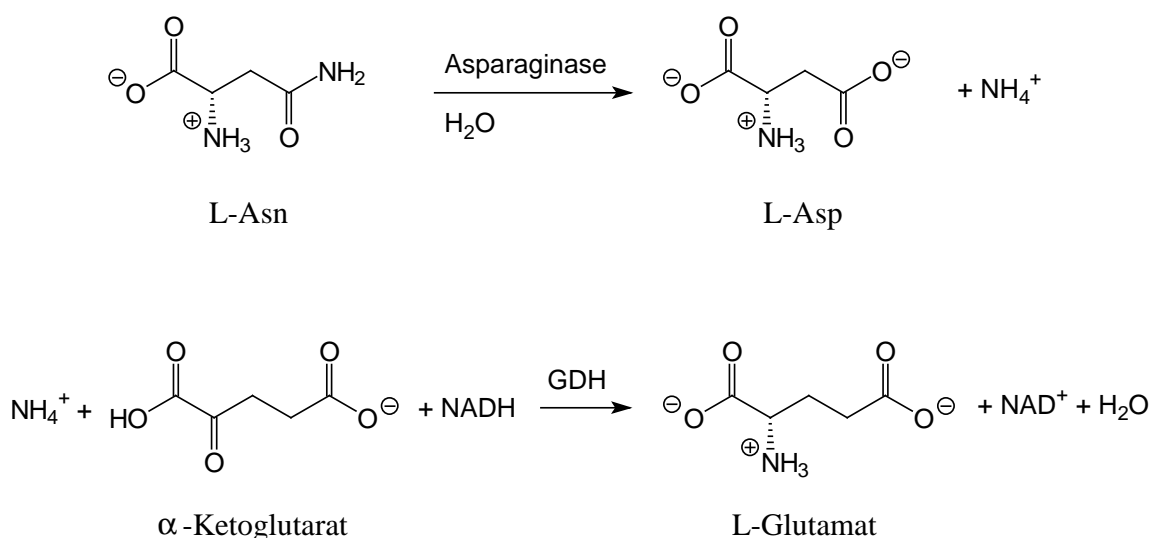
Die Zellen wurden auf M1-Agarplatten ausgestrichen und drei Tage bei 26 °C (*P. putida*) bzw. 30 °C (*P. fluorescens*) inkubiert. Von den frisch gewachsenen Zellen wurden Flüssigkulturen angeimpft und bei 26 oder 30 °C aerob inkubiert. Kulturen bis 10 mL wurden in einem Roller, größere Kulturen in Erlenmeyerkolben bei 240 Upm auf einem Inkubationsschüttler angezogen.

3.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden 500 µL einer Flüssigkultur mit 500 µL 40%iger steriler Glycerinlösung gemischt und die Zellen bei –80 °C gelagert.

3.3 Aktivitätsbestimmung der Asparaginase/Glutaminase

3.3.1 Bestimmung der Aktivität mittels gekoppeltem Enzymtest



Der Test beruht auf einer gekoppelten enzymatischen Reaktion. Zunächst wird Asparagin durch die Asparaginase in Aspartat umgesetzt. Das dabei entstehende NH_4^+

wird bei der reduktiven Aminierung von α -Ketoglutarat durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) unter Entstehung von Glutamat quantitativ umgesetzt. Dabei wird in stöchiomertrischen Mengen NADH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) zu NAD^+ oxidiert. Die Abnahme der Extinktion wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von fünf Minuten verfolgt.

Substrat:	Asparagin/Glutamin-Stammlösung; 20 mM in Puffer
Puffer:	100 mM MOPS; pH 7,0
α -Ketoglutarat-Lösung:	240 mM in H_2O ; pH 7,0
NADH/ADP-Lösung:	10 mM NADH, 50 mM ADP in H_2O (frisch angesetzt)
Glutamat-Dehydrogenase:	1,3 U/ μL in 50 % Glycerin

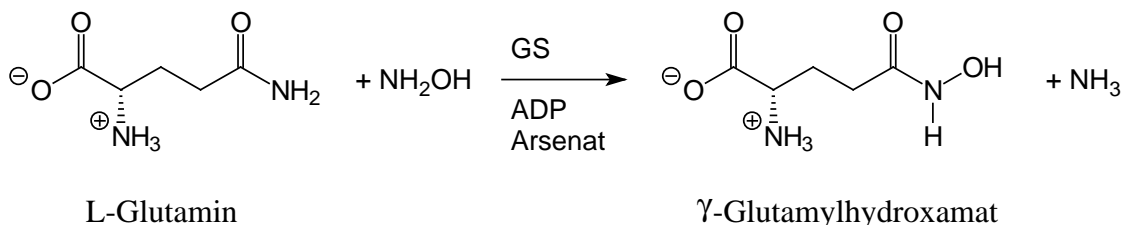
Die Reaktion wurde in Mikrotiterplatten in einem Gesamtvolumen von 300 μL durchgeführt. In 268 μL Puffer-/Substratlösung wurden 10 μL α -Ketoglutarat-Lösung, 10 μL NADH/ADP-Lösung und 2 μL Glutamat-Dehydrogenase vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL Enzymprobe gestartet und die Extinktionsabnahme mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes und des Computerprogramms PC-Kinetik-Collector (Fa. BioRad) direkt am PC verfolgt. Eine Abnahme der Extinktion aufgrund der Oxidation durch Luftsauerstoff oder Zersetzung von Glutamin wurde in Abwesenheit der Asparaginase bestimmt und die Meßergebnisse entsprechend korrigiert.

3.3.2 Bestimmung der Aktivität mit L-Asparaginsäure- β -Hydroxamat (AHA)

Bei der Umsetzung des Substratanalogons von Asparagin, L-Asparaginsäure- β -Hydroxamat, entsteht Hydroxylamin; dieses ist in einer größeren Empfindlichkeit nachweisbar als der bei der Umsetzung von Asparagin entstehende Ammoniak. Durch Zugabe von Oxinlösung bildet sich ein grüner Indoxinfarbstoff, dessen Extinktion bei 705 nm gemessen wurde ($\epsilon_{705\text{nm}} = 17500 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

3.4.3 Aktivitätsbestimmung der Glutamin-Synthetase (GS)

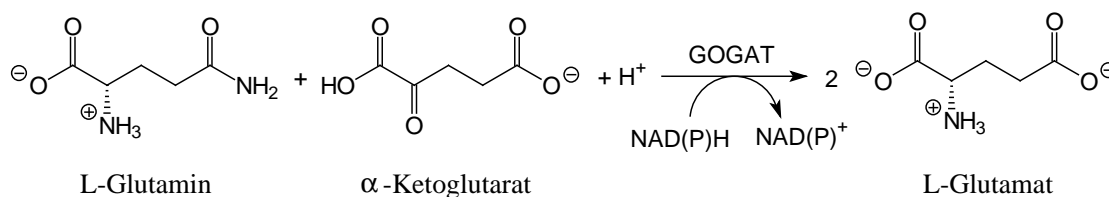
Die Aktivität der Glutamin-Synthetase wurde anhand ihrer γ -Glutamyltransferase-aktivität bestimmt [Bergmeyer, 1974; Shapiro und Stadtman, 1970; Meyer und Stadtman, 1981].



Probenreagenz:	Stop-Reagenz:
5 mL Tris-Puffer (0,8 M)	500 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
<i>P. fluorescens</i> pH 8,45	1 g TCA
<i>P. putida</i> pH 8,85	2,5 mL $\text{HCl}_{\text{konz.}}$
139 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	ad 30 mL H_2O
13 mg ADP-Na_3	
1 mL $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M)	
50 μL MnCl_2 (0,2 M)	
1 mL NaOH (2 M)	

Zu 70 μL Probenreagenz wurden 120 μL Glutamin (100 mM) gegeben und die Reaktion mit 10 μL Enzymprobe gestartet. Es wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, dann wurden 200 μL Stop-Reagenz zugegeben. Nach Zentrifugation wurde die Extinktion des Überstandes bei 540 nm gemessen. Die Aktivität wurde anhand einer Eichkurve von γ -Glutamylhydroxamat bestimmt. Dabei entspricht 1 U 1 μmol γ -Glutamylhydroxamat das pro min bei 37 °C entstanden ist.

3.4.4 Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Synthase (GOGAT)



Die enzymatische Aktivität der Glutamat-Synthase wurde, wie bei Meister und Meers beschrieben [Meister, 1985; Meers *et al.*, 1970], spektrophotometrisch durch Messung der Extinktionsabnahme von NAD(P)H ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) bestimmt. Der Test erfolgte in Mikrotiterplatten bei einem Endvolumen von 300 μL . Das Testgemisch enthielt 100 mM Tris/HCl (pH 7,8), 10 mM L-Glutamin, 0,35 mM NAD(P)H und 5 mM α -Ketoglutarat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL Enzymprobe gestartet und über einen Zeitraum von 5 min am PC verfolgt.

3.4.5 Aktivitätsbestimmung der Aspartase

Die Aspartase katalysiert die Desaminierung von Asparaginsäure. Dabei entstehen Fumarat und NH_4^+ . Die Aktivität der Aspartase wurde, wie bei Miyamoto [1992] beschrieben, anhand der entstandenen Ammoniumionen bestimmt. Die Reaktionsmischung enthielt bei einem Gesamtvolumen von 2 mL 100 mM L-Asparaginsäure, 3 mM MgCl_2 und 100 mM Tris/HCl (pH 9,0). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und 5 min bei 30 °C inkubiert. Man stoppte die Reaktion durch Zugabe von 200 μL TCA (50%ig). Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 200 μL 5 M NaOH versetzt und die Konzentration an NH_3 mit einer Ammoniak elektrode bestimmt.

3.5 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford [1976] bestimmt. In Mikrotiterplatten wurden 10 µL Enzymprobe mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden bei jeder Messung BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 10-150 µg/mL mitgeführt.

Bradford-Reagenz: 0,01 % (w/v) Serva Blau G
 5 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) 85 % Phosphorsäure

3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli [1970] durchgeführt.

Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid
 0,8 % Bisacrylamid

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Probenpuffer: 0,1 M Tris /HCl, pH 6,8
 2 % SDS
 3 % Mercaptoethanol
 10 % Glycerin
 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer (10x): 250 mM Tris/HCl
 1,9 M Glycin
 35 mM SDS

Molekulargewichtsmarker: Dalton-Mark VII-L™, Fa. Sigma

	Trenngellösung (12 %)	Sammelgellösung (4 %)
Acrylamidlösung	4 mL	0,65 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	--
Sammelgelpuffer	--	2,5 mL
1 % SDS-Lösung	1 mL	0,5 mL
87 % Glycerin	1 mL	--
H ₂ O	1,45 mL	2,5 mL
10 % APS-Lösung	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Die Proben wurden im Verhältnis 3:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min durch Kochen denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Minigel-Apparatur zunächst für 15 min bei 80 V, dann ca. 1 h bei 200 V.

3.7 Proteinfärbung mit Coomassie Blue

Färbelösung: 45 % Methanol
10 % Essigsäure
0,1 % (w/v) Serva Blau R

Entfärbelösung: 45 % Methanol
10 % Essigsäure

Das SDS-Gel wurde 15 min bei 50 °C unter Schwenken in der Färbelösung gefärbt und anschließend 30 min bei 50 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt. Nach Wässern wurde das Gel auf Filterpapier für 2 h bei 60 °C im Wasserstrahlpumpen-vakuum getrocknet.

3.8 Silberfärbung

<u>Fixierlösung:</u>	30 % Ethanol 30 % Essigsäure
<u>Thiosulfatpuffer:</u>	0,1 M Natriumacetat, pH 6,0 30 % Ethanol Zugabe von 100 mg Natriumthiosulfat zu 100 mL Lösung unmittelbar vor Gebrauch
<u>Silbernitratlösung:</u>	0,1 % (w/v) AgNO_3 Zugabe von 25 μL Formaldehyd unmittelbar vor Gebrauch
<u>Entwickler:</u>	2,5 % (w/v) Na_2CO_3 10 min vor Gebrauch 50 μL Formaldehyd pro 100 mL Lösung zugeben

Die Gele wurden zunächst 2x 15 min fixiert und dann 30 min mit Thiosulfatpuffer inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Wasser (je 10 min) erfolgte eine 25 minütige Inkubation in Silbernitratlösung. Nach kurzem Waschen der Gele mit destilliertem Wasser wurde für mehrere Minuten entwickelt. Bei dem gewünschten Färbegrad wurde die Reaktion mit 1 mL Eisessig abgestoppt.

3.9 Zweidimensionale Proteingelelektrophorese

Die zweidimensionale Proteingelelektrophorese kombiniert die Auftrennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) und ihrer molekularen Größe. Hierdurch werden sehr gute Auflösungen erreicht [O'Farrell, 1975].

3.9.1 Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten

Sämtliche Schritte des Aufschlusses wurden bei 4 °C durchgeführt.

<u>TE/PMSF-Puffer:</u>	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 0,3 mg/mL PMSF
------------------------	---

Die Bakterien wurden in 500 mL M9-Medium unter Verwendung der jeweils angegebenen N- und C-Quelle inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (OD_{600} ca. 0,3). Hierzu wurden die Zellen auf Eis gegeben und anschließend 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Die Bakterien wurden mit TE/PMSF-Puffer gewaschen, in 2 mL TE/PMSF-Puffer aufgenommen und durch Ultraschall (4x 15 sec) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 10000 Upm). Nach weiterer zweimaliger Zentrifugation (30 min, 14000 Upm) wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford [1976] bestimmt. Der Zellextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.9.2 Durchführung der 2D-Proteingelelektrophorese

Zur Probenvorbereitung wurden je 100 μg Protein mit dd H_2O auf ein Volumen von 100 μL gebracht und mit 350 μL Rehydratisierungslösung gemischt. Die Lösung wurde in die Probenschlitze eines dafür vorgesehenen Piacylblocks gefüllt und die IPG-Streifen (pH 3-10 oder pH 4-7) mit der Gelseite auf die Rehydratisierungslösung gelegt. Die Streifen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Dry-Strip-Cover-Fluid überschichtet, der Block mit einer Glasplatte abgedeckt und die Streifen für 24 Stunden bei RT inkubiert.

Rehydratisierungslösung für IPGs

1,92 g	Harnstoff
0,61 g	Thioharnstoff
80 mg	CHAPS
52,5 μL	Pharmalyte 3-10
17,5 mg	DTT
ad 3 mL	dd H_2O

Nach dem Lösen wurde eine Spatelspitze Bromphenolblau zugegeben.

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte durch Isoelektrofokussierung mit dem Multiphor-System. Zur Vorbereitung der Fokussierungs-Kammer gab man etwa 10 mL Mineralöl auf die Kühlplatte und legte den IPG-Gelaufsatz luftblasenfrei auf. Es wurden 15-20 mL Mineralöl in die IPG-Kammer gegeben und die Plastikfolie für IPG-Streifen darauf gelegt. Die IPG-Streifen wurden aus der Rehydratisierungslösung genommen, mit dd H₂O abgespült und auf Filterpapier gelegt. Zum Entfernen von überschüssigem Harnstoff wurde Filterpapier mit Wasser angefeuchtet und zweimal kurz auf die Streifen aufgelegt. Anschließend wurden die IPG-Streifen zwischen die Erhebungen der Plastikfolie gelegt, wobei das saure Ende in Richtung der Kühlschläuche zeigte. Auf die Enden der IPG-Streifen legte man mit dd H₂O angefeuchtete Papierstreifen, vor den Papierstreifen des alkalischen Endes zusätzlich einen mit 15 mM DTT-Lösung benetzten Papierstreifen. Nach dem Aufsetzen der Elektroden wurde die Kammer mit etwa 100 mL Mineralöl gefüllt und das Programm am Stromversorgungsgerät gestartet.

Programm:

1. Stufe Gradient	500 V	1 mA	5 W	1000 Vh	2 h
2. Stufe	500 V	1 mA	5 W	2000 Vh	5 h
3. Stufe Gradient	3500 V	1 mA	5 W	10000 Vh	4 h
4. Stufe	3500 V	1 mA	5 W	35000 Vh	10 h

2. Dimension: SDS-PAGE

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen für die zweite Dimension äquilibriert, indem sie nacheinander je 15 min in Äquilibrierungslösung A und B auf einem Schüttler inkubiert wurden. Anschließend wurden sie auf SDS-Polyacrylamidgele aufgelegt und in SDS-Agarose eingegossen. Die Elektrophorese erfolgte 6-7 h mit 20 W pro Gel und für etwa weitere 14 Stunden bei 8-10 W pro Gel.

Äquibrierungslösung (5 Gele)

A	B	
2,5 mL	2,5 mL	0,5 M Tris / HCl, pH 6,8
9 g	9 g	Harnstoff
7,5 mL	7,5 mL	Glycerin 99 %
10 mL	10 mL	SDS 10%ige Lösung
ad 25 mL	ad 25 mL	dd H ₂ O
87,5 mg	---	DTT
---	1,125 g	Iodacetamid
---	1,5 mg	Bromphenolblau

Trenngel (6 Gele) - 12 % Acrylamid

167,65	mL	40 % Acrylamid
89,5	mL	2 % Bisacrylamid
136,26	mL	1,5 M Tris pH 8,8
5,74	mL	10 % SDS-Lösung
150	mL	dd H ₂ O
1,4	mL	10 % APS-Lösung
275	µL	TEMED

Die Gele wurden mit einer Gießapparatur gegossen, mit dd H₂O überschichtet und etwa 1,5 Stunden polymerisiert.

Sammelgelpuffer (4x), pH 6,8

6	g	Tris/HCl
4	mL	10 % SDS-Lösung
ad 100	mL	dd H ₂ O

Sammelgel (6 Gele)

5,4	mL	40 % Acrylamid
2,7	mL	2 % Bisacrylamid
15	mL	Sammelgelpuffer
36,9	mL	dd H ₂ O
0,22	mL	10 % APS-Lösung
33	µL	TEMED

Das Sammelgel wurde mit einer Pipette vorsichtig auf das Trenngel gegossen, mit dd H₂O überschichtet und für 30 min polymerisiert.

SDS-Agarose

1 g Agarose
25 mL Sammelgelpuffer (4x)
ad 100 mL dd H₂O

3.9.3 Silberfärbung

Fixierlösung: 50 % Ethanol
12 % Essigsäure
0,05 % Formaldehyd

Thiosulfatpuffer: 0,02 % Na₂S₂O₃ · 5 H₂O

Silbernitratlösung: 0,2 % (w/v) AgNO₃
0,075 % Formaldehyd (37 %)

Entwickler: 6 % (w/v) Na₂CO₃
0,004 % (w/v) Na₂S₂O₃ · 5 H₂O
0,05 % Formaldehyd

Die Gele wurden 1-3 h fixiert, 3x 30 min mit 50%igem EtOH gewaschen und dann für 1 min in Thiosulfatpuffer geschwenkt. Anschließend wurden sie 3x 20 sec mit dd H₂O gewaschen und 20 min in Silbernitratlösung inkubiert. Nach weiterem Waschen mit dd H₂O (2x 20 sec) wurde für 1-3 min entwickelt. Die Gele wurden erneut mit dd H₂O gewaschen (2x 30 sec) und dann zum Abstoppen der Reaktion für 10-30 min in 1 % Glycinlösung inkubiert. Die Gele wurden weitere 30 min und dann über Nacht in destilliertem Wasser geschwenkt.

3.10 N-terminale Proteinsequenzierung

Proteinproben zur N-terminalen Aminosäuresequenzierung wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels „Semi-Dry-Verfahren“ [Kyhse-Anderson, 1984] auf eine PVDF-Membran transferiert.

<u>Puffer 1:</u>	0,3 M Tris/HCl, 20 % Methanol pH 10,4
<u>Puffer 2:</u>	25 mM Tris/HCl 20 % Methanol pH 10,4
<u>Puffer 3:</u>	40 mM ϵ -Aminocapronsäure 25 mM Tris/HCl 20 % Methanol pH 9,4
<u>Ponceaulösung:</u>	0,2 % (w/v) Ponceau in 3 % (w/v) Trichloressigsäure
<u>Entfärbelösung:</u>	50 % Methanol

Je 4 Filterpapiere wurden mit den Puffern 1, 2 und 3 angefeuchtet. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol gelegt und dann ebenso wie das Gel kurz in Puffer 2 equilibriert. Die Blotting-Apparatur wurde von unten nach oben wie folgt zusammengesetzt:

oben

- Anode
- Filterpapiere in Puffer 1
- Filterpapiere in Puffer 2
- Immobilon P (PVDF-Membran)
- Gel
- 4 Filterpapiere in Puffer 3
- Kathode

unten

Der Zusammenbau mußte luftblasenfrei erfolgen. Geblottet wurde 3 h bei 0,8 mA pro cm² Gel (hier 60 mA). Die Membran wurde dann mit Wasser gespült (2 x 5 min), 10 min mit Ponceaulösung gefärbt, 30 min mit 50 % Methanol entfärbt und nochmals zweimal 15 min mit Wasser gewaschen. Die gewünschten Banden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, nochmals 3x 10 min gewässert und dann bei -20 °C gelagert.

Die Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Linder (Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität in Gießen) durchgeführt.

3.11 Isolierung der Asparaginasen aus *P. fluorescens*

Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.11.1 Zellfraktionierung

Isolierung periplasmatischer Enzyme

Sphäroplastenpuffer: 100 mM Tris / HCl pH 8,5
 500 mM Saccharose
 0,5 mM EDTA

Für eine präparative Isolierung der Enzyme wurden die Bakterienzellen in 1 L M9-Medium mit 10 mM Asparagin als N- und C-Quelle bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen.

Zur Isolierung von periplasmatischen Enzymen wurde die Kultur für 15 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit 10 mM Tris/HCl gewaschen, in 30 mL Sphäroplastenpuffer resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 6000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem dd H₂O sowie 1 mL MgCl₂ (20 mM) versetzt und weitere 5 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (20 min, 6000 Upm) wurde der Überstand, der die periplasmatischen Enzyme enthielt, vorsichtig abgenommen, anschließend portionsweise bis zu 100%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und bei 4 °C gelagert.

Zur Isolierung der cytosolischen Enzyme wurde das Bakterienpellet in der angegebenen Reihenfolge mit 25 mL Sphäroblastenpuffer, 1,25 mL Lysozym-Lösung (2 mg/mL) und 25 mL dd H₂O versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde 20 min bei 6000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 mL Tris/HCl (50 mM, pH 7,5) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zur Beseitigung von Zelltrümmern wurde 30 min bei 12000 Upm zentrifugiert und der nun klare Proteinextrakt abgenommen, bis zu 100%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

3.11.2 Chromatofokussierung

<u>Säulenmaterial:</u>	PBE 94, Fa. Pharmacia
<u>Startpuffer:</u>	25 mM Ethanolamin/CH ₃ COOH, pH 9,4
<u>Elutionspuffer:</u>	Polybuffer 96 / CH ₃ COOH 1:10 mit dd H ₂ O verdünnt, pH 7,0

Das Proteinpellet der Ammoniumsulfatfällung wurde in möglichst wenig Startpuffer aufgenommen und zweimal gegen 1 L des gleichen Puffers dialysiert. Nichtlösliche Bestandteile wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 14000 Upm abgetrennt.

Die Chromatofokussierungssäule (1x 35 cm) wurde mit 200 mL des Startpuffers und vor dem Auftragen der Proteinprobe mit 2-3 mL Elutionspuffer gespült. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 18 mL pro Stunde und es wurden Fraktionen von 1,5 mL aufgefangen. Von den einzelnen Fraktionen wurde der pH-Wert und die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels Aktivitätstest (vgl. 3.3.2, S. 21) und SDS-Gelelektrophorese. Nach der Chromatographie wurde die Säule mit 50 mL 1,5 M NaCl gespült um noch gebundene Proteine zu entfernen und konnte dann bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.11.3 Anionenaustausch-Chromatographie mit MonoQ

<u>Säulenmaterial:</u>	MonoQ HR5/5 (Pharmacia, Freiburg)
<u>Puffer A:</u>	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
<u>Puffer B:</u>	Puffer A + 1 M NaCl
<u>Flußrate:</u>	1 mL/min
<u>Gradient:</u>	0-1 M NaCl in 30 mL, Fraktionsgröße: 0,5 mL

Die Enzymprobe wurde in Puffer A umgepuffert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf die mit Puffer A equilibrierte Säule aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde mit einem Säulenvolumen Puffer A von der Säule gewaschen. Gebundenes Protein wurde in einem Gradienten von 0-1 M NaCl von der Säule eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

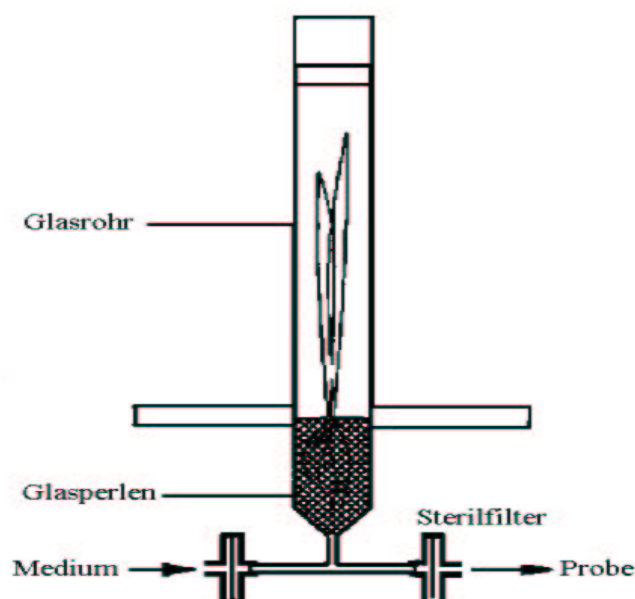
3.12 Analyse von Wurzelexsudaten

3.12.1 Anzucht von Pflanzenkeimlingen aus Weizen-, Reis- und Gerstesamen

Hypochlorit-Lösung:

105	mL	Hypochlorit (12%ig)
3	g	Na ₂ CO ₃
100	g	NaCl
5	g	NaOH
ad 1	L	dd H ₂ O

Die Samenschale wurde entfernt und die Samen zur Desinfektion für 40 min in einem sterilen Gefäß in Hypochloritlösung geschüttelt. Sie wurden dann dreimal für je 30 min in autoklaviertem Wasser auf dem Schüttler geschwenkt und anschließend auf Hefeagarplatten bei Licht zum Keimen gebracht. Die 5-10 Tage alten Keimlinge wurden dann unter sterilen Bedingungen in das in der folgenden Abbildung dargestellte Kulturgefäß überführt. Als Nährstofflösung diente 7 mL Hoagland-Medium, das mittels einer Spritze durch einen Sterilfilter in das Gefäß gegeben wurde. Die Pflanzen wuchsen bei Tageslicht und Raumtemperatur. Durch das Kulturgefäß war es problemlos möglich, die Pflanzen auch über längere Zeiträume (ca. 3 Monate) steril zu kultivieren. Außerdem konnte die wiederholte Probennahme von ein und derselben Pflanze nach verschiedenen Zeiträumen erfolgen. Die Sterilität der Lösung wurde bei der Probenentnahme durch Ausstreichen auf Agarplatten überprüft.



3.12.2 Aufarbeitung der Wurzelexsudate

Nach einem Zeitraum von 4-50 Tagen wurden die Exsudate mit einer Spritze entnommen. Das Kulturgefäß wurde nochmals mit 7 mL dd H₂O gespült, beide Lösungen vereinigt, unter Vakuum bis zur Trockne eingengt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die weitere Aufarbeitung der Exsudate erfolgte gemäß Simons *et al.* [1997]. Um die in den Wurzelexsudaten enthaltenen Aminosäuren zu isolieren, wurde das Lyophylisat in 1-2 mL dd H₂O aufgenommen, zur Abtrennung von nichtlöslichen Bestandteilen 20 min bei 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand auf das Kationenaustauschermaterial Dowex AG50W-X8 (BioRad, München) aufgetragen. Das Säulenmaterial wurde vor Gebrauch für zwei Stunden mehrmals mit 0,5 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen, für 8 Stunden in 7%iger Ameisensäure geschüttelt und anschließend mit 1%iger Ameisensäure gewaschen und darin bei 4° C aufbewahrt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Säulenmaterial nochmals mit 2 Säulenvolumen 1%iger Ameisensäure gewaschen und dann bis zur Neutralität mit dd H₂O behandelt. Es wurden je 1 mL Säulenmaterial in 2 mL-Eppendorfcups verteilt, die Exsudatprobe aufgetragen und gründlich gemischt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials wurde der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde zuerst mit 300 µL 1 mM HCl, dann mit 4 Säulenvolumen 50 mM HCl gespült um neutrale und negativ geladene Komponenten zu entfernen. Die gebundenen Aminosäuren wurde mit 4 Volumen 4 M Ammoniumhydroxid-Lösung eluiert. Die Proben wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt, zur Entfernung von Ammoniak mehrmals in dd H₂O aufgenommen, erneut lyophilisiert und dann bei -20°C aufbewahrt.

3.12.3 Aminosäureanalyse der Wurzelexsudate mittels HPLC

<u>Kopplungspuffer:</u>	35 % H ₂ O
	30 % Acetonitril
	25 % Pyridin
	10 % Triethylamin
<u>PITC:</u>	Phenylisothiocyanat
<u>Puffer A:</u>	50 mM Natriumacetat
	2,75 % Triethylamin
	pH 6,4 (Phosphorsäure), durch einen Membranfilter filtriert
<u>Puffer B:</u>	50 % Puffer A
	40 % Acetonitril
	10 % Methanol
<u>Säule:</u>	RP-Selekt, 5µm, 0,45 cm Ø, 20 cm Länge, Fa. Merck

Das Lyophilisat aus 3.12.1 wurde in 50 µL Kopplungspuffer resuspendiert und im Vakuum eingengt. Die Aminosäuren unterzog man einer Derivatisierung mit PITC, indem das Pellet zunächst in 100 µL Kopplungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µL PITC 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus 5 µL Acetonitril und 95 µL Puffer A gelöst. Mittels eines Autosamplers wurden je 20 µL Probe auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Säulentemperatur von 60 °C und wurde bei 254 nm mit einem UV-Detektor registriert. Es wurde der folgende Gradient verwendet:

Zeit (min)	0	20	33	33,5	44	50	50,5	54,5	55	63
Puffer A (%)	98	98	83	60	55	35	0	0	98	98
Puffer B (%)	2	2	17	40	45	65	100	100	2	2

Als Standard diente ein Aminosäuregemisch (Sigma) aus Aspartat, Glutamat, Serin, Glycin, Thryptophan, Alanin, Prolin, Tyrosin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Lysin, Cystin und Ammoniak. Zusätzlich wurden Standards an Asparagin und Glutamin mitgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe des Programms PeakFit (SPSS-Science, Chicago) integriert. Eine Quantifizierung erfolgte

durch Vergleich mit einem Aminosäuretestgemisch. Um Verluste auszugleichen, die während der Aufarbeitung der Exsudate entstanden, wurde das Testgemisch ebenso behandelt wie die zu analysierenden Proben. Die eindeutige Zuordnung der Peaks erfolgte durch Zugabe von bekannten Aminosäuren zu den Proben.

3.13 Detektion der Metabolite von $^{15}\text{NH}_4^+$ und $^{15}\text{NH}_2\text{R}$ aus Glutamat mittels NMR-Spektroskopie

Die Bakterien wurden in 1 L M9-Medium mit 5 mM Ammoniak oder Glutamat als Stickstoffquelle bis zur logarithmischen Phase angezogen. Man zentrifugierte die Zellen 15 min bei 6000 Upm, wusch sie in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) und resuspendierte sie in 500 mL M9-Medium, welches 3 mM ^{15}N -markiertes Ammoniumchlorid oder Glutamat enthielt. Die Kulturen wurden für weitere drei Stunden auf einem Schüttler inkubiert, wobei die Abnahme von Ammoniumchlorid mit Hilfe einer Ammoniakelektrode verfolgt wurde sowie die Zunahme der Zelldichte registriert wurde. Die Extraktion der Aminosäuren erfolgte wie unter [Kanamori *et al.*, 1987] angegeben. Die Zellen wurden pelletiert (20 min, 6000 Upm) und dreimal für eine Stunde in 60%igem Ethanol extrahiert. Das Zellpellet wurde in 0,2 M Natriumcitratpuffer (pH 5,0) resuspendiert und zur Extraktion der polaren Aminosäuren für 15 min bei 55 °C inkubiert. Die Extrakte wurden vereinigt und mit einem Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 mL eingengt. Zum Abtrennen von säureunlöslichen Bestandteilen wurde die Lösung auf pH 2 gebracht, zentrifugiert, auf pH 6,5 eingestellt und weiter eingengt. Für die NMR-Messung gab man zu 750 µL Zellextrakt 2 mg EDTA und 10 % (v/v) D_2O .

Die NMR-Messung erfolgte an einem Bruker AMX 500 Spektrometer nach dem HMQC-Verfahren mit dem bei Braun [1996] angegebenen Gradientenpuls und einem Polarisationsdelay von 10 Hz. Die Spektrometerfrequenz betrug 500,13 MHz für Protonen und 50,68 MHz für ^{15}N . Als Referenz wurde Formamid eingesetzt.

3.14 Konzentrationsbestimmung von NH_3 , Asparagin und Aspartat im Medienüberstand

Um Hinweise auf bevorzugte Stickstofflieferanten der Pseudomonaden zu bekommen wurde der Verbrauch von verschiedenen N-Quellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht. Hierzu wurde neben der Quantifizierung mittels HPLC-Messungen eine NH_3 -Elektrode eingesetzt.

Eine Übernachtskultur der Bakterien in M9-Medium wurde 15 min bei 6000 Upm abzentrifugiert, das Bakterienpellet zweimal mit 200 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und auf M9-Medium mit der gewünschten N-Quelle umgesetzt. Im Abstand von 30 min wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Messung wurden die Proben mit dd H_2O auf ein Endvolumen von 9 mL aufgefüllt und NH_4^+ -Ionen durch Zugabe von 100 μL 5 M NaOH quantitativ in NH_3 überführt. Enthielt das Medium neben NH_4^+ -Ionen auch Asparagin wurde zunächst der NH_3 -Gehalt dieser Probe ohne Zusatz von Asparaginase bestimmt. Zu einer zweiten Probe gab man 10 μL *E.coli* Asparaginase (2,5 U/ μL) und bestimmte die NH_3 -Konzentration nach zweistündiger Inkubation. Aus der Differenz errechnet sich die Konzentration von Asparagin im Medium.

Für Bestimmungen mittels HPLC wurden definierte Probenmengen mit PITC derivatisiert und in 20 μL -Portionen auf die Säule (RP-Selekt) aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 90 % Puffer A und 10 % Puffer B. Die erhaltenen Chromatogramme wurden integriert und mittels entsprechender Eichkurven quantifiziert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Vorbemerkung

Die in den Versuchen verwendeten Medien wurden zur einfacheren Beschreibung zum Teil mit den folgenden Abkürzungen bezeichnet: M9: M9-Minimalmedium, Glc: Glucose, NH_4^+ : Ammoniumchlorid, Asn: Asparagin, Asp: Aspartat, Gln: Glutamin, Glu: Glutamat. Eingefügte Zahlen geben die verwendeten Konzentrationen wieder. Die Bezeichnung M9-Glc10/Asn10 beschreibt also M9-Minimalmedium, in dem Glucose und Asn (je 10 mM) enthalten sind. PfGA: *P. fluorescens*-Glutaminase-Asparaginase, PfA: *P. fluorescens*-Asparaginase, PsGA: *Pseudomonas*-Glutaminase-Asparaginase

4.2 Verwertung von Aminosäuren als Stickstoffquelle

4.2.1 Wachstum auf Aminosäuren als Stickstoffquelle

Um Aussagen darüber zu treffen, ob verschiedene *Pseudomonas*-Stämme Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle verwerten können, wurde ihr Wachstum in M9-Medium gemessen. Dabei diente jeweils Glucose als Kohlenstoffquelle. Für die Versorgung mit Stickstoff wurde Ammoniumchlorid oder die angegebenen Aminosäuren verwendet. Abb. 3 zeigt Wachstumskurven von *P. fluorescens* (WT) unter den beschriebenen Kulturbedingungen.

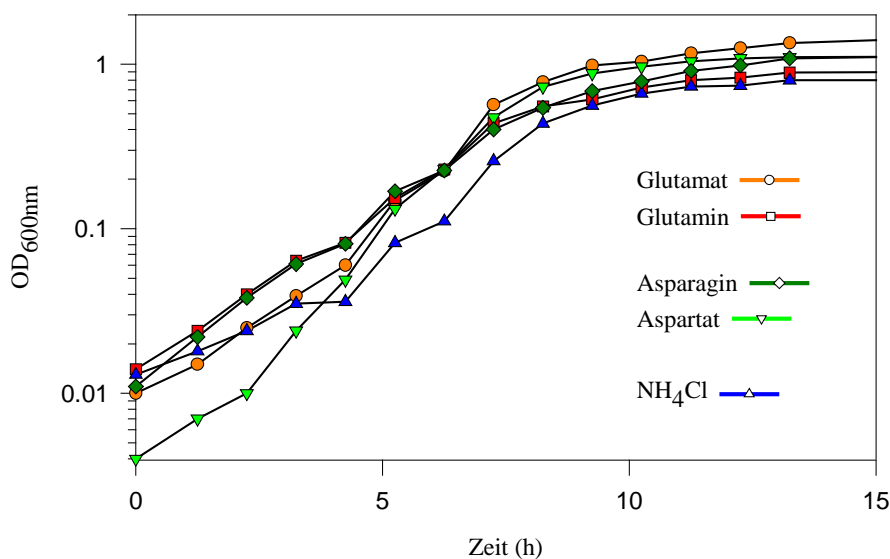


Abb. 3: Wachstumskurve von *P. fluorescens* (WT) in M9-Medium in halblogarithmischer Auftragung. Als C-Quelle diente 20 mM Glucose, als N-Quelle NH_4Cl , oder die angegebenen Aminosäuren in 5 mM Endkonzentration. In der logarithmischen Phase bestand ein direkter Zusammenhang zwischen der Zunahme der Zelldichte und der optischen Dichte.

Wie aus der Abbildung erkennbar ist, können die getesteten Aminosäuren gut verwertet werden. In der stationären Phase erreichen die Kulturen, denen eine Aminosäure zugegeben wurde, sogar eine höhere OD₆₀₀ als Kulturen die auf NH₄Cl als N-Quelle wuchsen. In der exponentiellen Wachstumsphase besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Zunahme der Zelldichte und der optischen Dichte. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 betrug die ermittelte Zellzahl etwa $1,5 \cdot 10^8$ Keime/mL. Die Wachstumsrate, die ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums in der exponentiellen Wachstumsphase ist, war mit etwa $0,5 \text{ h}^{-1}$ auf den verschiedenen Medien etwa gleich. Dementsprechend betrugen die Verdopplungszeiten ca. 1-1,5 Stunden. Ähnliche Ergebnisse zeigten Wachstumskurven von *P. putida* (WT).

Die Verwertbarkeit weiterer Aminosäuren als Stickstoff-Lieferanten wurde ebenfalls anhand des Bakterienwachstums überprüft. In M9-Medium legte man neben 10 mM Glucose die in der folgenden Tabelle (Tab. 4) aufgeführten Aminosäuren in 5 mM Endkonzentration vor. Bakterienzellen wurden in Vorkulturen in M9-Medium mit Glucose und NH₄Cl als C- und N-Quelle angezogen und nach dreimaligem Waschen mit Kaliumphosphatpuffer-Puffer (100 mM, pH 7) auf die jeweiligen Medien umgesetzt. Das Zellwachstum wurde 3 und 5 Stunden nach dem Umsetzen anhand der OD₆₀₀ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Wachstum von *P. fluorescens* (WT), *P. putida* (WT) und *P. fluorescens* Pf-5 auf verschiedenen Aminosäuren als N-Quelle. Mit „++“ ist besonders gutes Wachstum (OD-Zunahme > 0,25), mit „+“ gutes Wachstum (OD-Zunahme 0,1-0,2) und mit „(+“ geringes Wachstum (OD-Zunahme 0-0,05) vermerkt. Die Bakterien wuchsen auf M9-Medium mit 10 mM Glucose und den Aminosäuren in 5 mM Endkonzentration.

	Asn	Gln	Arg	His	Lys	Trp
<i>P. fluorescens</i> (WT)	++	++	++	(+)	(+)	(+)
<i>P. putida</i> (WT)	++	++	++	(+)	(+)	(+)
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	++	++	++	(+)	(+)	(+)

	Pro	Ala	Val	Leu	Ile	Cys	Ser	Asp	Glu
<i>P. fluorescens</i> (WT)	+	++	+	+	+	(+)	+	++	++
<i>P. putida</i> (WT)	+	++	+	+	+	(+)	++	++	+
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	+	++	+	+	+	(+)	++	++	++

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß von den stickstoffreichen Aminosäuren insbesondere Asn, Gln und Arg und von den Aminosäuren ohne weitere Stickstoffatome in der Seitenkette Ala, Asp und Glu ein besonders gutes Wachstum ermöglichen.

4.2.2 Enzyme des N-Stoffwechsels der Bakterien *P. fluorescens* (WT) und *P. putida* (WT)

Wie schon in der Einleitung erwähnt, decken viele Bakterien ihren Stickstoffbedarf bevorzugt aus Ammonium-Ionen. Hierbei existieren zwei assimilatorische Wege, deren Endprodukte, Glutamin und Glutamat, als Schlüsseldonatoren für Stickstoff dienen. Dabei wird NH_4^+ entweder durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat (Glutamat-Dehydrogenase) oder durch ATP-abhängige Amidierung von Glutamat zu Glutamin (Glutamin-Synthetase) assimiliert, gefolgt von einer reduktiven Umsetzung von Glutamin und α -Ketoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat (Glutamat-Synthase). Eine weitere mögliche Rolle für die Stickstoffversorgung spielen Amidasen, die Asparagin und Glutamin zu NH_4^+ und den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysieren (vgl. 1.7, S.12).

Es war von Interesse, inwieweit sich die Aktivitäten der genannten Enzyme von der angebotenen Stickstoffquelle beeinflussen lassen. Unterschiede der Aktivitäten könnten Hinweise auf bevorzugte Wege bei der N-Assimilation geben. Auch Einflüsse der Stickstoffquelle auf Induktion und Repression dieser Enzyme sollten erkennbar sein.

Für die Aktivitätsbestimmung wurden die Zellen in M9-Minimalmedium bis zur späten logarithmischen Phase inkubiert, geerntet, mit Testpuffer gewaschen und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. In den Zellextrakten wurden die spezifischen Aktivitäten von Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Glutamin-Synthetase (GS), Glutamat-Synthase (GOGAT) sowie Asparaginase und Glutaminase gemäß der Beschreibung im Methodenteil (vgl. 3.4, S. 23) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt.

Aufgeführt sind Mittelwerte aus drei Zellaufschlüssen mit jeweiliger Dreifachbestimmung der entsprechenden Aktivitäten.

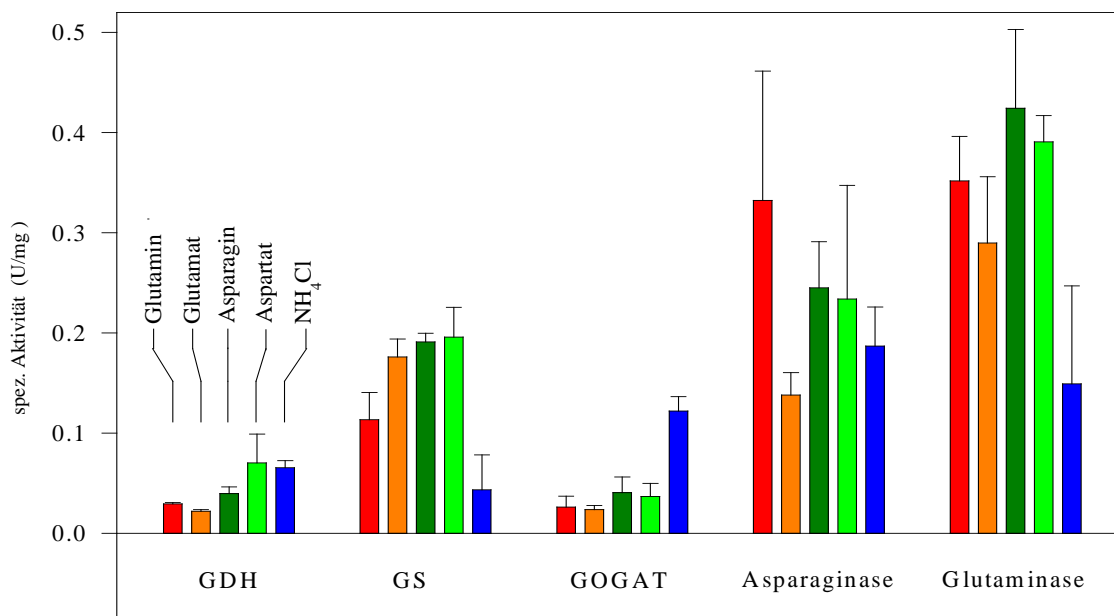


Abb. 4: Schlüsselenzyme der Stickstoffassimilation in *P. fluorescens* (WT). Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten von Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Glutamin-Synthetase (GS), Glutamat-Synthase (GOGAT) sowie Asparaginase und Glutaminase. Die Zellen wurden in Minimalmedium (M9) mit 20 mM Glucose und 10 mM der angegebenen N-Quelle bis zur späten logarithmischen Phase angezogen, geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Aktivitätsbestimmung der Enzyme erfolgte wie in Kap. 3.4 (S. 23ff) beschrieben.

Unter den gegebenen Bedingungen waren alle drei Schlüsselenzyme des N-Stoffwechsels aktiv. Die GS zeigte unter Anwesenheit der vier Aminosäuren höhere Aktivitäten als bei einem Wachstum auf NH₄Cl. Entgegengesetzt war das Verhältnis bei der GOGAT. Die Aktivität der GDH war unter den fünf verschiedenen Kulturbedingungen etwa gleich. Zwischen den vier eingesetzten Aminosäuren ist in ihrem Einfluß auf die Aktivitäten der untersuchten Enzyme kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Vergleichsweise hohe spezifische Aktivitäten zeigte die Asparaginase und Glutaminase.

4.2.3 Nachweis von Metaboliten des N-Stoffwechsels mittels ¹⁵N-NMR-Spektroskopie

Verwendet man für die Stickstoffversorgung von Bakterien ¹⁵N-markierte Substanzen, so lassen sich Verbindungen in die dieser Stickstoff eingebaut wird mittels ¹⁵N-NMR-Spektroskopie identifizieren. Durch diese Methode können Rückschlüsse auf Intermediate des N-Stoffwechsels gewonnen werden. Für diesen Versuch verwendete man ¹⁵NH₄Cl sowie Amino-¹⁵N-markiertes Glutamat. Die Bakterien wurden von einer

Vorkultur ausreichender Zelldichte in Medien mit den markierten Substanzen als Stickstoffquelle überimpft. Nach weiterem dreistündigem Wachstum wurden die Zellen pelletiert, wie unter 3.13 (S. 39) beschrieben aufgeschlossen und die Zellextrakte durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie analysiert. Durch inverse Detektion der ^{15}N -Resonanz über gekoppelte Protonen (HQMC-Spektrum) wurde ein Intensitätsgewinn der Signale erreicht. Abb. 5 zeigt ein NMR-Spektrum eines Zellextraktes von *P. fluorescens* (WT) in dem $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als N-Quelle eingesetzt wurde. Zur Identifizierung der Signale wurden ^{15}N -markierte Substanzen in Zellextrakt gelöst und unter identischen Bedingungen vermessen. Als Standard diente Formamid.

Die Kreuzpeaks bei etwa 2 ppm im Protonenspektrum und -310 ppm im ^{15}N -Spektrum sind den Aminogruppen von Glutamin (1a) und Glutamat (1b) zuzuordnen. Peak (2) stammt von der Amidgruppe des Glutamins. Hierbei erfolgte die Zuordnung von Glutamat durch ein Vergleichsspektrum der markierten Substanz und ist somit eindeutig. Glutamin wurde aufgrund der relativen chemischen Verschiebung des ^{15}N -Signals zu Glutamat [Berger, 1992] sowie einer typischen Resonanz im Amidbereich, der sowohl im ^{15}N -, als auch im Protonenspektrum auftrat, zugeordnet.

Die Gruppe starker Kreuzpeaks bei 8,5/-120 ppm (3) deutet auf heterocyclische Aromaten wie Purinbasen und -Nucleotide hin, für deren Synthese Glutamin als N-Donor dient.

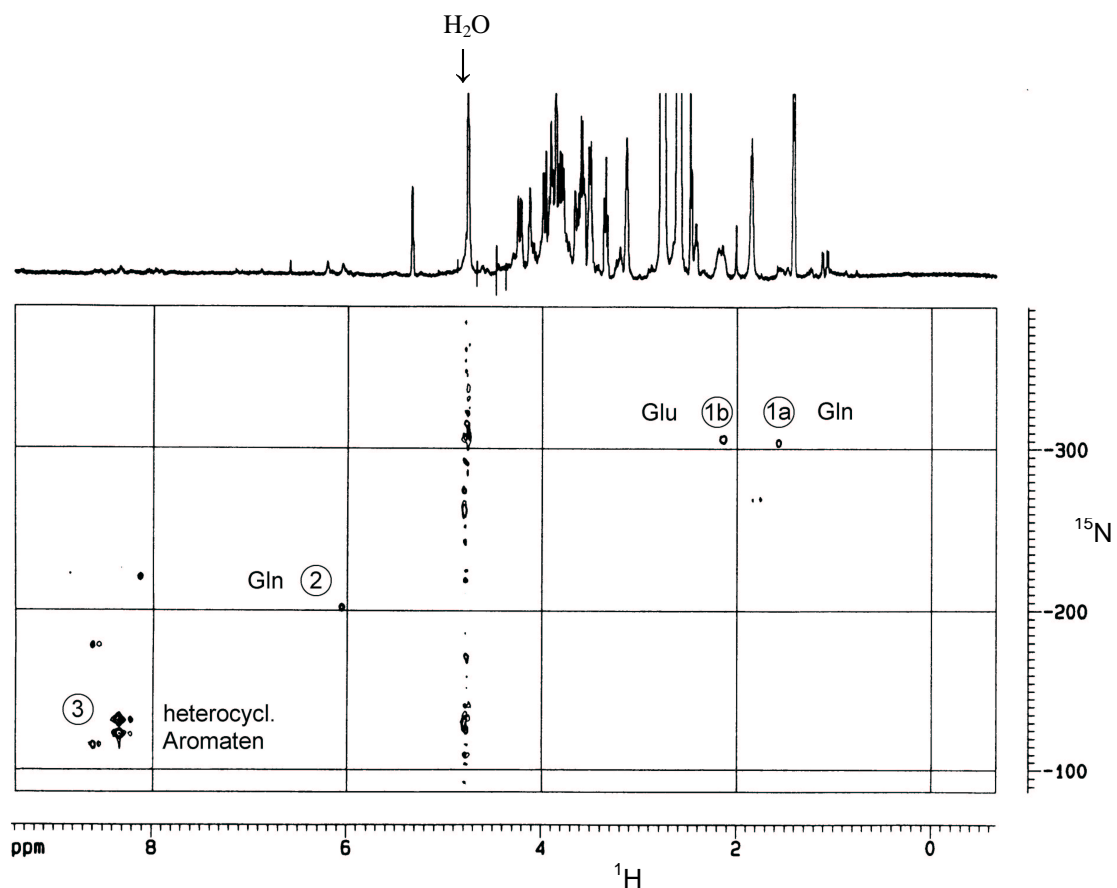


Abb. 5: ^{15}N - ^1H -Korrelationsspektrum eines Zellextraktes von *P. fluorescens* (WT). Als N-Quelle diente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Zu 750 μL eines konzentrierten Zellextraktes des pH-Wertes 6,5 wurden 2 mg EDTA und 10 % D_2O gegeben. Die Messung erfolgte mit einem Bruker AMX-Spektrometer nach dem HMQC-Verfahren mit einem Polarisationsdelay von 10 Hz. Die Spektrometerfrequenz betrug 500,13 MHz für Protonen und 50,69 MHz für ^{15}N . Als Referenz diente Formamid. 1a, 1b: Aminogruppe Gln und Glu. 2: Amidgruppe Gln. 3: heterocyclische Aromaten.

Identische Spektren erhielt man mit ^{15}N -markiertem Glutamat als N-Quelle. Die Spektren zeigen, daß assimilierter Stickstoff in den Metaboliten Glutamat und Glutamin nachzuweisen ist. Diese Aminosäuren scheinen, wie z.B auch in Enterobakterien, eine zentrale Rolle als N-Donatoren einzunehmen.

4.3 Verwertung von Asparagin durch *P. putida* (WT) und *P. fluorescens* (WT)

4.3.1 Asparagin als N-Quelle

In diesem Versuch sollten Hinweise auf bevorzugte Stickstoffquellen von *P. putida* erhalten werden. Bakterienzellen einer Vorkultur in M9-Medium (10 mM Glucose, 10 mM NH_4Cl) wurden nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) auf M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose umgesetzt. Als N-Quelle waren in diesen Medien NH_4Cl , Asn oder ein äquimolares Gemisch von NH_4Cl und Asn (10 mM) enthalten. Die Medienkonzentrationen der Stickstoff enthaltenden Komponenten wurden in Abhängigkeit von der Kulturdauer verfolgt. Eine Quantifizierung erfolgte wie in 3.14 beschrieben mittels einer NH_3 -Elektrode oder HPLC-Messungen. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

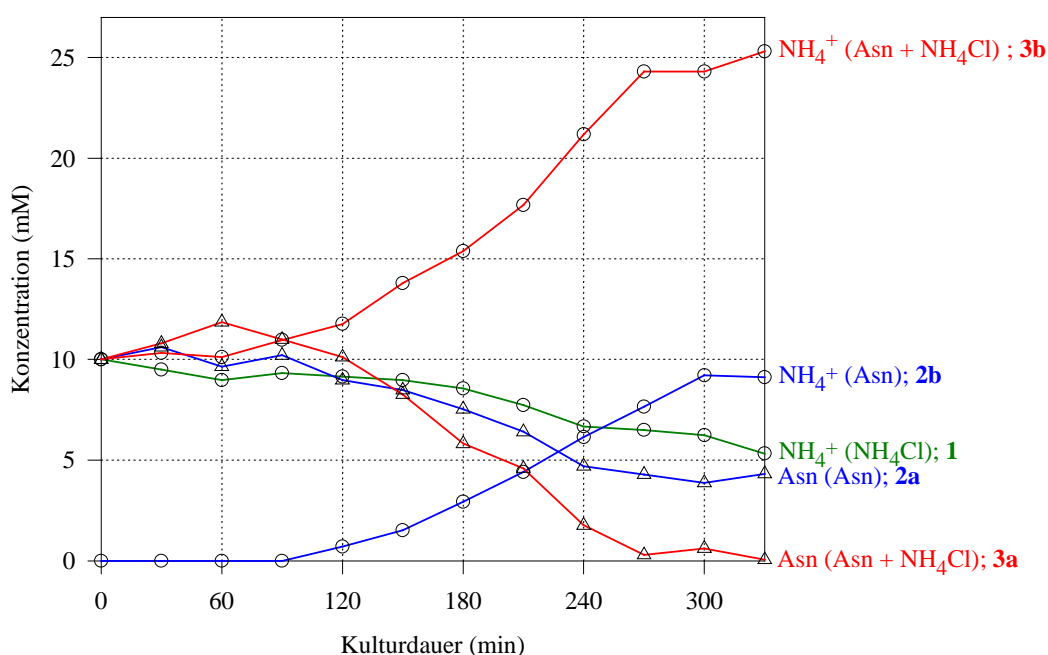


Abb. 6: Medienkonzentration von Asparagin und NH_4^+ in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zellen einer Vorkultur von *P. putida* (WT) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf M9-Medium mit 10 mM Glucose als C-Quelle und **1:** NH_4Cl , **2:** Asn und **3:** NH_4Cl + Asn (je 10 mM) als N-Quelle umgesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Medienkomponenten wurden mit einer NH_3 -Elektrode oder HPLC-Messungen bestimmt, vgl. 3.14.

Wurden Asparagin oder NH_4Cl als einzige N-Quelle angeboten, so nahm die Konzentration beider Nährstoffe mit dem Verlauf der Kulturzeit ab (Abb. 6: **1**, **2a**). Dabei war in dem Asparagin enthaltenden Medium gleichzeitig eine etwa stöchiometrische Zunahme an NH_4^+ -Ionen meßbar (**2b**). Das war selbst dann der Fall, wenn

neben Asparagin bereits NH_4^+ im Medium vorhanden war (**3b**). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß Asparagin extrazellulär hydrolysiert wird. Das aus dem Amidstickstoff entstandene NH_4^+ verbleibt über den Zeitraum der Messung fast quantitativ im Medium, auch wenn Asparagin die einzige N-Quelle ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß Asparagin unter diesen Bedingungen nicht in erster Linie als Stickstoffquelle sondern bevorzugt als C-Quelle dient. Vergleichbare Resultate zeigten sich bei demselben Versuch mit Glutamin.

4.3.2 Asparagin als C-Quelle

Bakterien aus einer Vorkultur (20 mM Glucose, 10 mM NH_4Cl) wurden nach Zentrifugation und Waschen mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) auf M9-Medium umgesetzt, das 20 mM Glucose und 10 mM Asparagin enthielt, sowie auf ein zweites Medium, in dem Asparagin (10 mM) als einzige C- und N-Quelle vorhanden war. In den folgenden Versuchen wurde neben den Medienkonzentrationen von Asparagin und NH_4^+ auch die Konzentration von Aspartat im Medium in Abhängigkeit von der Kulturdauer bestimmt.

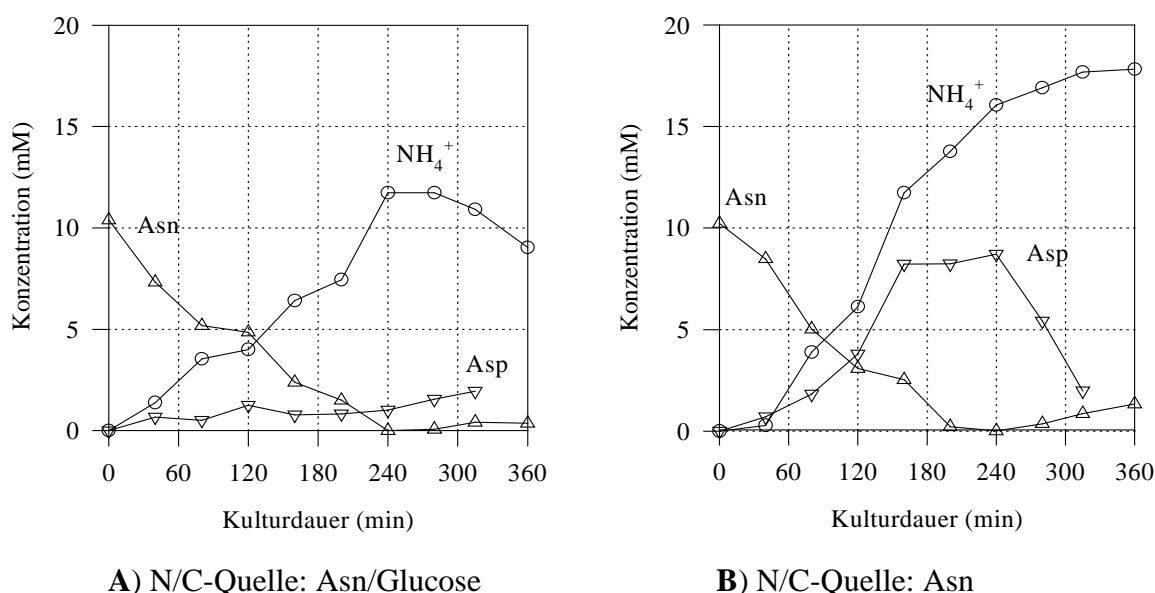


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Asn, Asp und NH_4^+ einer Kultur von *P. fluorescens* (WT) in M9-Medium. In **B** diente Asn als einzige N- und C-Quelle (10 mM), in **A** war zusätzlich 20 mM Glucose im Medium enthalten. Die Konzentration von Asp und Asn wurde mittels HPLC, die Ammoniumkonzentration wurde mit einer NH_3 -Elektrode bestimmt.

Diente Asparagin als einzige N- und C-Quelle, so wurde es etwas schneller verwertet als in einem Medium in dem zusätzlich Glucose vorhanden war. Gleichzeitig akkumulierte in **B** Aspartat zunächst und nahm erst im weiteren Kulturverlauf ab, während die Aspartatkonzentration in **A** über die Kulturdauer gering blieb. In beiden Kulturen stieg die Konzentration an NH_4^+ -Ionen über die stöchiometrische Menge von Asparagin hinaus an. Dies spricht für eine weitere Umsetzung von Aspartat unter erneuter Freisetzung von NH_4^+ -Ionen. Auch diese Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung von Asparagin als C-Quelle hin.

4.4 Verwertung der Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat durch verschiedene *Pseudomonas*-Stämme – beteiligte Enzyme und deren Eigenschaften

4.4.1 Aktivität der Aspartase in *P. fluorescens* (WT)

Die unter 4.3.2 (S. 48) gezeigten Ergebnisse deuten auf eine weitere Umsetzung von Aspartat hin. Um zu überprüfen, ob dafür eine Aspartase verantwortlich ist, wurde deren Aktivität im Periplasma und im Cytosol ebenfalls unter verschiedenen Induktionsbedingungen analog zur Asparaginase bestimmt. Untersucht wurde die Aktivität des Enzyms in Medien der folgenden Zusammensetzungen: 1.) M9-Glc/ NH_4^+ , 2.) M9-Glc/Asn, 3.) M9-Glc/Gln, 4.) M9-Asn, 5) M9-Gln. Unter keiner dieser Bedingungen konnte eine wesentliche Induktion festgestellt werden. Die Volumenaktivität bei einer OD_{600} der Bakterienkulturen von etwa 0,7 betrug bei allen Kulturen für das Periplasma 0,05 ($\pm 0,03$) U/mL, die Aktivitäten für das Cytosol etwa 0,5 U/mL.

4.4.2 Aktivität und Lokalisation der Asparaginasen aus *P. fluorescens* (WT)

Die in den vorausgegangenen Untersuchungen nachgewiesene extrazelluläre Hydrolyse von Asparagin und Glutamin könnte auf ein ins Medium sezerniertes oder auf ein periplasmatisch lokalisiertes Enzym zurückzuführen sein. Um dies zu klären, wurden die Aktivitäten im Zellüberstand nach Abzentrifugieren der Zellen (extrazelluläre Enzyme) in der Zellsuspension (periplasmatische Enzyme) und nach Ultraschallbehandlung der Zellen (cytosolische Enzyme) gemessen. Dabei wuchsen die Bakterien auch diesmal unter verschiedenen Nährstoffangeboten und zwar in M9-

Medium, wobei entweder Glucose und Asparagin/Glutamin im Medium vorhanden waren, oder aber Asparagin/Glutamin als einzige N- und C-Quelle dienten. Als Vergleich wurden die Zellen in M9-Medium inkubiert, das nur Glucose und NH_4Cl enthielt. In diesem Versuch wurde zur Bestimmung der Asparaginaseaktivitäten das Substratanalogon von Asparagin, AHA, verwendet (vgl. 3.3.2, S. 21). Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt.

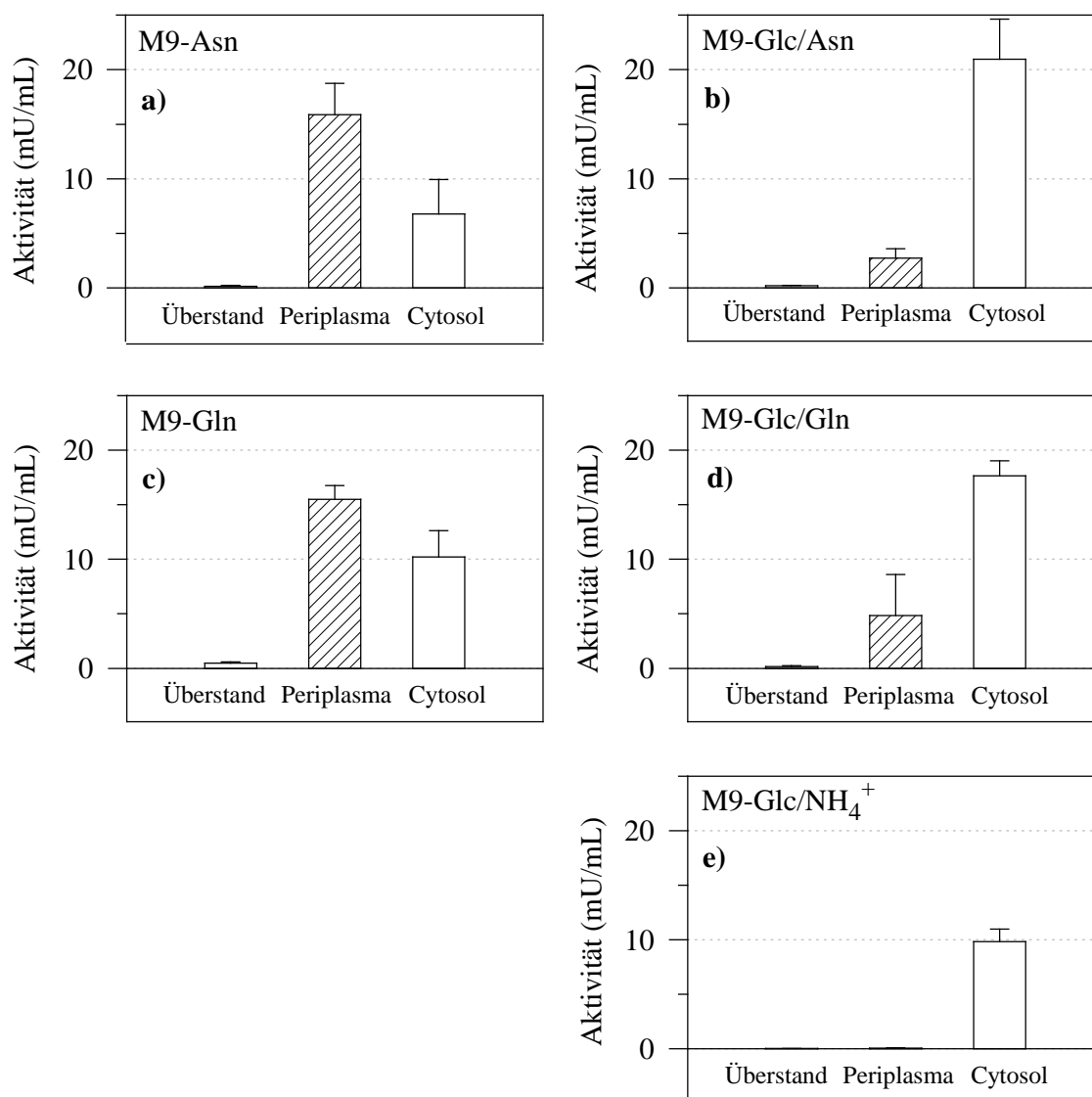


Abb. 8: Aktivitäten der Asparaginasen von *P. fluorescens* (WT) in Zellüberstand, Periplasma und Cytosol. Die Bakterien wuchsen auf den angegebenen N- und C-Quellen. Die Aktivitätsbestimmung des Überstandes erfolgte nach Pelletieren der Zellen. Für die Aktivitätsbestimmung der periplasmatischen Asparaginase verwendete man Zellsuspension intakter Zellen, die cytosolische Aktivität wurde nach Ultraschallaufschluss und Subtraktion der periplasmatischen Aktivität berechnet. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte der Aktivitätsbestimmungen von vier verschiedenen Kulturen bei etwa gleicher optischer Dichte zu Beginn der stationären Phase. Die Aktivitätstests erfolgten mit dem Substratanalogon AHA (siehe 3.3.2, S. 21).

Für die Hydrolyse von Asparagin und Glutamin im Medium scheint ein periplasmatisches Enzym verantwortlich zu sein. Im zellfreien Überstand war nur eine geringe Aktivität nachweisbar. Allerdings wurde in früheren Wachstumsphasen und insbesondere dann, wenn Zellen auf neues Medium umgesetzt wurden, eine etwas höhere Aktivität im Zellüberstand gemessen als hier gezeigt ist. Die Werte kamen auf bis zu 20 % der im Periplasma bestimmten Aktivität. Es ist aber wahrscheinlich, daß die im Zellüberstand gemessenen Aktivitäten auf eine Sekretion des periplasmatischen Enzyms in den Zellüberstand zurückzuführen ist. Dafür spricht eine im Verhältnis identische Aktivitätszunahme bei Bakterienwachstum auf M9-Asn bzw. das Fehlen beider Aktivitäten auf M9-Glc/NH₄⁺. Das „extrazelluläre“ Enzym wird außerhalb der Zelle in späteren Wachstumsphasen offensichtlich schnell durch Proteasen abgebaut. Eine Aktivitätszunahme der Asparaginase im Periplasma ist bei Wachstum der Bakterien auf Asparagin und Glutamin als einziger N- und C-Quelle zu beobachten, während die Aktivität bei Vorhandensein von Glucose deutlich geringer ist und ohne Asparagin fast keine Induktion erfolgt. Zusätzlich wurde eine cytosolische Asparaginase gemessen, deren Aktivität aber nicht so stark von den Nährstoffen im Medium beeinflusst wurde.

4.4.2.1 Aktivität der periplasmatischen Asparaginase in Biokontrollstämmen und pflanzenpathogenen Stämmen im Vergleich

Die bisherigen Untersuchungen wurden im Wesentlichen an den beiden Stämmen *P. fluorescens* (WT) und *P. putida* (WT) durchgeführt (Abb. 9 links). Es wurden nun weitere Bodenbakterien auf die Aktivität einer im Periplasma vorhandenen PsGA untersucht. Die in der Mitte in Abb. 9 aufgeführten Stämme sind Biokontrollstämmen.

P. fluorescens W34, *P. fluorescens* W24 und *P. putida* II 232 sind Antagonisten gegen den Pilz *Pythium ultimum*, der Samen und Wurzeln von Gurken angreift [Schulz und Werner, 1998]. *P. fluorescens* W24 unterdrückt Mehltau sowie das Tabaknekrosevirus. Das Rhizosphärenbakterium *P. fluorescens* Pf-5 unterdrückt verschiedene Pflanzenpathogene und produziert Antibiotika wie Pyrrolnitrin und Pyoluteorin [Sarniguet *et al.*, 1992]. Diese Gruppe zeigt hohe Asparaginaseaktivitäten. Die in der Abb. 9 rechts aufgeführten pflanzenpathogenen Stämme *P. syringae* pv. *glycinea* und *P. syringae* pv. *tomato* zeigen fast keine Aktivität einer periplasmatischen Amidohydrolase.

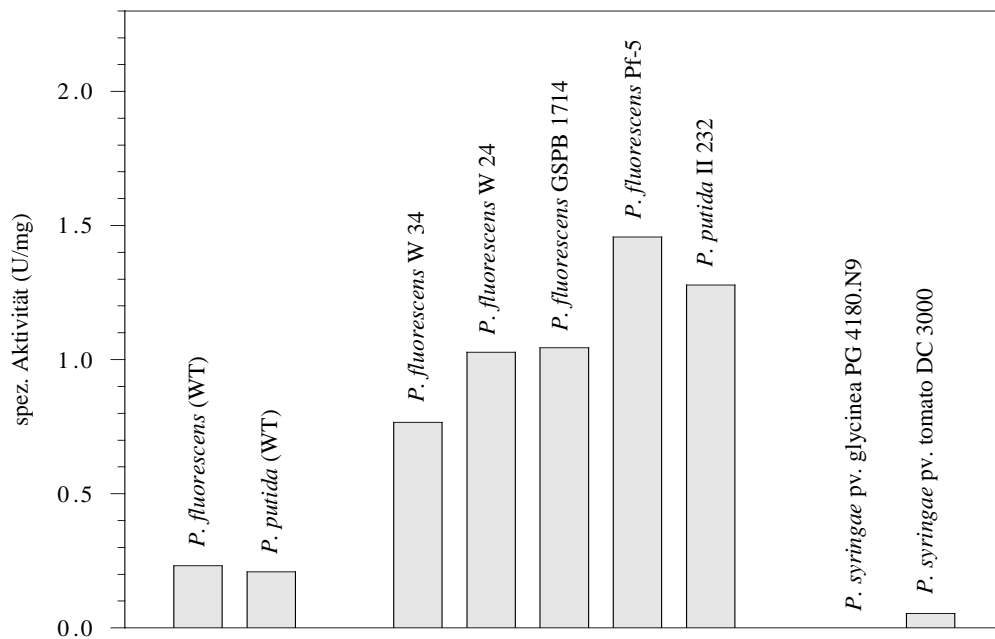


Abb. 9: Spezifische Aktivitäten der PsGA bei den Wildtypstämmen *P. fluorescens* (WT) und *P. putida* (WT) (links), Biokontrollstämmen (Mitte) und pflanzenpathogenen Stämmen (rechts). Die Bakterien wuchsen auf M9-Medium mit 10 mM Asn als einziger N- und C-Quelle. Die Enzymaktivität wurde mit dem Substratanalogon AHA bei intakten Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase gemessen.

4.4.3 Auswirkung von C-Quellen auf die Aktivität der PfGA

Für diesen Versuch werden die Bakterien in M9-Medium mit den in Abb. 10 angegebenen Nährstoffen angezogen. Die Kulturen wurden aus einer Übernachtskultur der gleichen Zusammensetzung angeimpft, die Aktivitätsmessung erfolgte bei einer OD_{600} von etwa 0,7. Die Aktivitätsbestimmung des periplasmatischen Enzyms erfolgte mit intakten Zellen. Die Aktivität des cytosolischen Enzyms wurde in Zellhomogenaten bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Enzymaktivitäten mit und ohne Zusatz von pCMB gemessen. Da das cytosolische Enzym durch pCMB inaktiviert wird (vgl. Tab. 5), ließen sich aus der Differenz beider Meßgrößen die Aktivität des cytosolischen Enzyms berechnen.

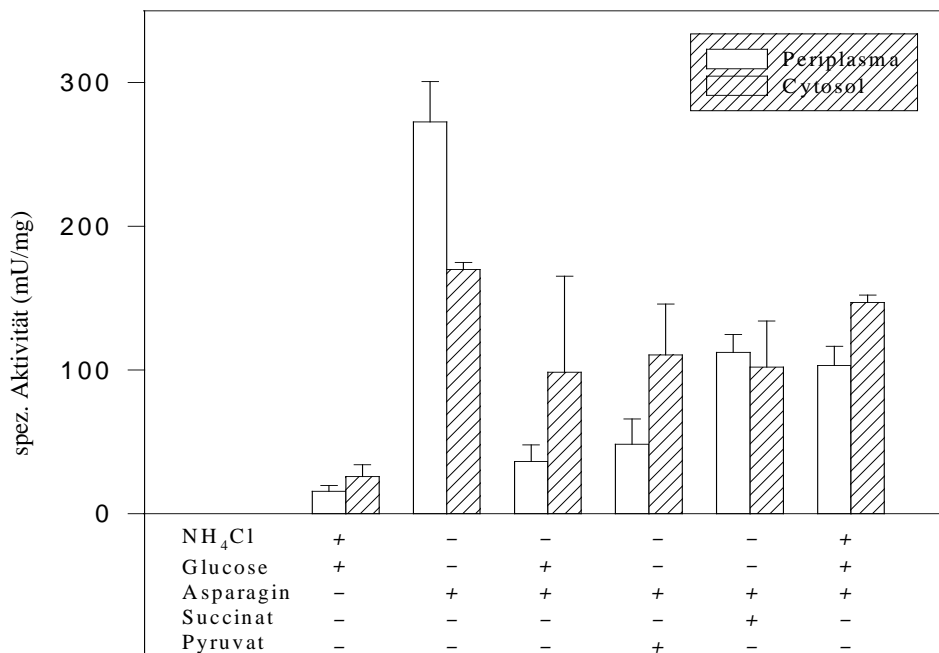


Abb. 10: Aktivitäten der periplasmatischen und der cytosolischen Asparaginase aus *P. fluorescens* (WT) in Abhängigkeit von der C- und N-Quelle (je 10 mM Endkonzentration). Die Zellen wurden mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Enzymaktivität vor Zugabe von pCMB (Aktivität des periplasmatischen und cytosolischen Enzyms) und nach Zugabe von pCMB (Hemmung der cytosolischen Asparaginase) gemessen. Für die Aktivitätsbestimmung wurde das Asparaginanalogen AHA verwendet (vgl. 3.3.2)

Wie Abb. 10 zeigt, wird die Aktivität des periplasmatischen Enzyms durch Asparagin stark induziert wenn diese Aminosäure als einzige N- und C-Quelle angeboten wird. Wird NH₄Cl als N-Quelle und Glucose als C-Quelle eingesetzt, so ist das periplasmatische Enzym fast vollständig reprimiert. Eine Katabolitrepression der PfGA erfolgt auch dann, wenn neben Asparagin andere C-Quellen zugesetzt werden. Untersucht wurden in diesem Fall Glucose, Succinat und Pyruvat, wobei der Effekt bei Glucose am stärksten war. In keinem Fall ging aber die Aktivität auf einen so geringen Grundwert zurück wie er auf Glucose/NH₄Cl beobachtet wurde. Die Aktivität der cytosolischen Asparaginase zeigte einheitlichere Werte, und schien nicht so stark davon beeinflusst zu sein, ob neben Asparagin weitere Kohlenstoffquellen angeboten wurden.

Die entsprechende Messung einer Übernachtskultur mit Zellen zu Beginn der stationären Phase zeigten für das periplasmatische Enzym ähnliche Tendenzen (nicht gezeigt). Die Aktivitäten des cytosolischen Enzyms waren jedoch einheitlicher und lagen bei etwa 250 mU/mg. Bei dem cytosolischen Enzym scheint im Gegensatz zur periplasmatischen Asparaginase in späteren Wachstumsphasen in einem Medium in dem Glucose und NH₄Cl enthalten sind eine Induktion zu erfolgen.

4.4.3.1 Auswirkung von C-Quellen auf die Aktivität einer periplasmatischen Asparaginase in Biokontrollstämmen

Die bereits an *P. fluorescens* (WT) durchgeführten Induktions- und Repressionsexperimente wurden an verschiedenen Biokontrollstämmen durchgeführt, um Rückschlüsse darauf zu erhalten, ob die periplasmatische Asparaginase hier ähnlich reguliert wird. Die Aktivitäten in Abb. 11 sind in % angegeben und beziehen sich auf den höchsten Wert der Messung, der auf 100 % gesetzt wurde.

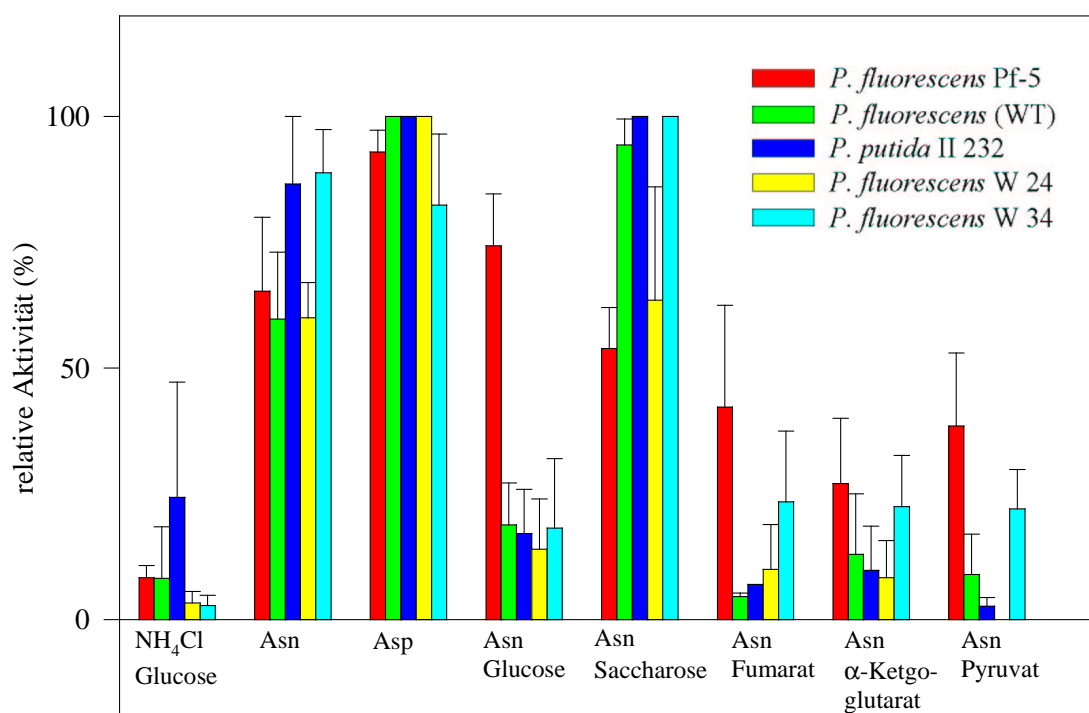


Abb. 11: Induktion und Repression der periplasmatischen Asparaginase bei verschiedenen Biokontrollstämmen. Die Aktivitäten beziehen sich auf den jeweils höchsten gemessenen Aktivitätswert, der mit 100 % definiert wurde. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit AHA bei intakten Zellen ca. drei Stunden nach Umsetzen der Zellen von M9-Glc/NH₄⁺ auf die angegebenen Medien. Die Meßergebnisse zeigen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Es scheint bei diesen Stämmen eine ähnliche Regulation in Bezug auf Induktion und Repression durch C-Quellen vorzuliegen wie im Falle der Asparaginase aus *P. fluorescens* (WT) und *P. putida* (WT). Eine starke Induktion des Enzyms ist bei Wachstum auf Asp und Asn als einziger C-Quelle erkennbar. Auf Medium, das nur Ammoniumchlorid/Glucose enthielt, ist eine geringe Asparaginaseaktivität meßbar. Durch C-Quellen wie Glucose, Fumarat, α-Ketoglutarat und Pyruvat, die zusätzlich zu Asparagin im Medium vorhanden waren, wurde das Enzym reprimiert. Dies ist allerdings nicht bei Zugabe von Saccharose als C-Quelle der Fall. Eine deutlich geringere Katabolitrepression durch Glucose und auch andere C-Quellen ist bei *P. fluorescens* Pf-5 zu erkennen.

4.4.4 Auswirkungen der Abbauprodukte Aspartat und Glutamat auf die Aktivität der PfGA

Aus einer Vorkultur von *P. fluorescens* (WT), die auf M9-Medium mit Glucose als C- und NH_4Cl als N-Quelle gewachsen war, wurden die Bakterienzellen nach Pelletieren und zweimaligem Waschen mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) in Medien überführt in denen Asn, Gln, Asp und Glu als einzige C- und N-Quelle enthalten waren. Die Aktivität der periplasmatischen Asparaginase wurde über einen Zeitraum von 6 h gemessen. Zusätzlich wurden die Medienkonzentrationen von Asn, Asp, Gln und Glu mittels HPLC-Analyse verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 wiedergegeben.

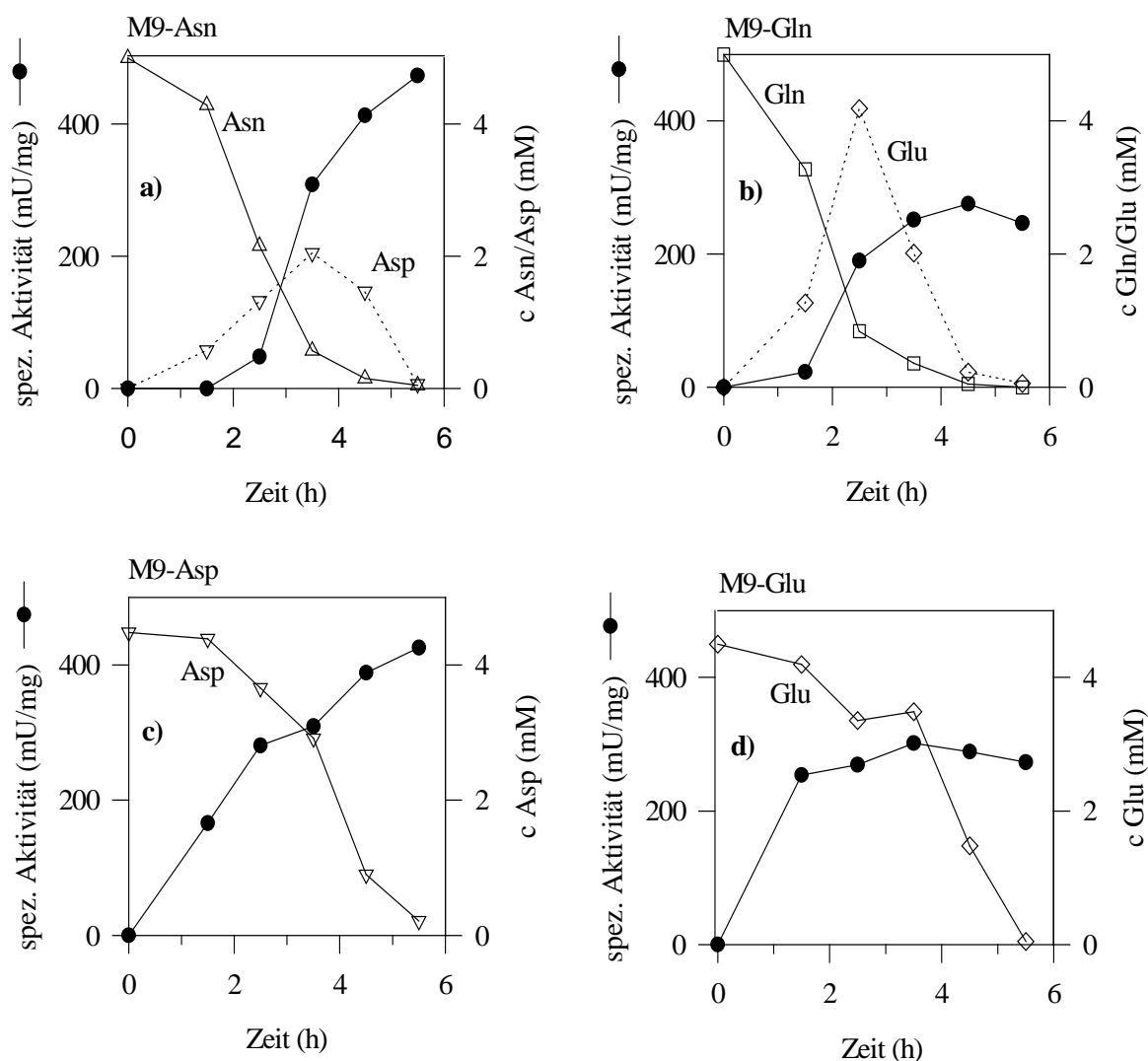


Abb. 12: Aktivität der PfGA mit Asp und Glu bzw. den entsprechenden Säureamiden als Induktor (●). Gemessen wurden zusätzlich die Konzentrationen von Asn (Δ), Asp (▽), Gln (□) und Glu (◇) im Medienüberstand.

Die PfGA wird auch durch ihre Reaktionssprodukte Asp und Glu induziert. Wie in Abb. 12 erkennbar ist, erfolgt dies sogar schneller als durch Asn und Gln bei denen die Aktivitätszunahme erst nach einiger Zeit einsetzt. Erst ab einer gewissen Konzentration von Asp/Glu im Medium erfolgt überhaupt eine Induktion. Daraus ergibt sich die Frage ob die Säureamide der eigentliche Induktor des Enzyms sind. Wie schon zuvor beobachtet akkumuliert Asp/Glu zunächst im Medium bevor die Konzentration stetig abnimmt.

4.4.5 Untersuchungen zur Aufnahmegeschwindigkeit von Aspartat/Glutamat durch *Pseudomonas fluorescens* (WT)

In dem folgenden Versuch sollten Hinweise darauf erhalten werden, ob für die Aufnahmen von Glu und Asp dieselben oder verschiedene Transportsysteme verantwortlich sind und ob diese Systeme induzierbar sind. Hierzu wurden Bakterienzellen auf M9-Medium mit Glucose und NH_4Cl als C- und N-Quelle inkubiert. Sie wurden nach zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer auf die folgenden Medien umgesetzt: NH_4Cl /Glucose, Asp, Glu. Die Zellen wurden weitere drei Stunden inkubiert, um zu gewährleisten, daß sie sich den neuen Nährstoffbedingungen angepaßt hatten. Die Zellen wurden anschließend erneut gewaschen und je zu gleichen Teilen auf M9-Medien mit Asp, Glu, Asp+Glu umgesetzt. Die Konzentrationen von Asp und Glu im Medienüberstand wurden in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (vgl. Abb. 13).

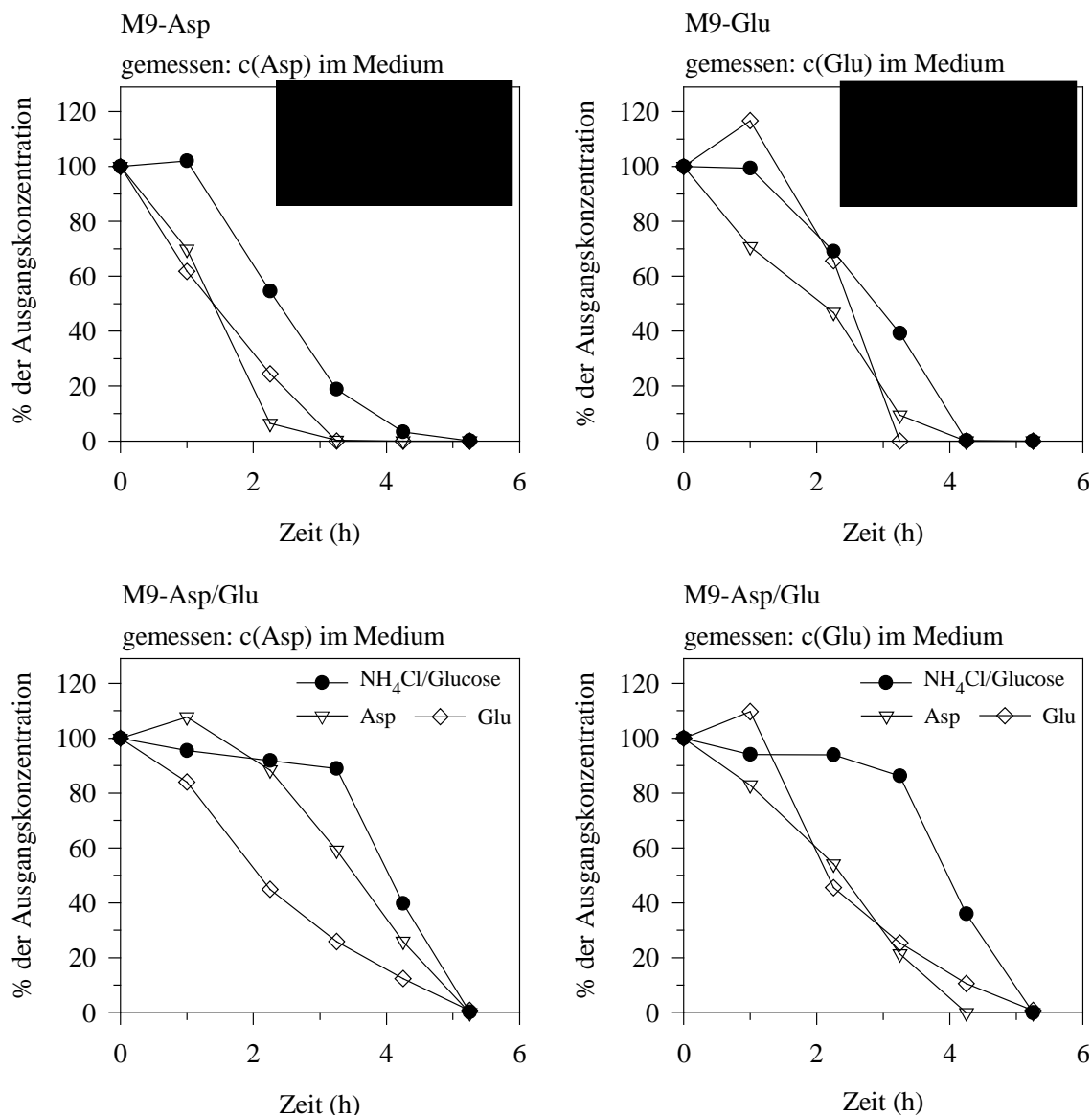


Abb. 13: Konzentrationsänderung von Asp und Glu im Medienüberstand. Nach Anzucht der Zellen in M9-NH₄Cl/Glucose (●), M9-Asp (▽) und M9-Glu (◇) wurden die Bakterien auf die Medien a) M9-Asp, b) M9-Glu, sowie c) und d) M9-Asp/Glu umgesetzt und die Konzentrationsabnahme von Asp und Glu in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die Konzentrationen der Aminosäuren wurden nach Derivatisierung mit PITC mittels HPLC bestimmt. Die Ausgangskonzentration der Aminosäuren im Medium wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

Aus Abb. 13 läßt sich erkennen, daß es nicht zu einem deutlich schnelleren Konzentrationsabnahme von Asp oder Glu im Medium kommt, wenn eine dieser Aminosäuren bereits in der Vorkultur zur Verfügung stand. Auffällig ist eine zunächst nur geringe Abnahme, wenn die Vorkultur auf NH₄Cl/Glucose inkubiert wurde und auf ein Medium umgesetzt wurde, das gleichzeitig Asp und Glu enthielt. Eine deutliche Konzentrationsabnahme erfolgte hier mit einer Verzögerung von etwa drei Stunden.

4.4.6 Reinigung der PfGA

Durch eine Reinigung der Asparaginasen des Bakteriums *P. fluorescens* (WT) sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

- 1) Welche Substratspezifitäten und sonstige Eigenschaften besitzen die Asparaginasen aus Periplasma bzw. Cytosol?
- 2) Durch eine N-terminale Sequenzierung des gereinigten periplasmatischen Enzyms sollte geklärt werden, ob das von Hüser [1999] aus *P. fluorescens* klonierte *ansB*-Gen für das regulierte periplasmatische Enzym kodiert.

P. fluorescens (WT) wurden in 2 L M9-Medium mit 10 mM Asparagin als einziger N- und C-Quelle bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden, wie unter 3.11.1 (S. 34) beschrieben, fraktioniert, so daß periplasmatische und cytosolische Proteine separat vorlagen. Die mit Ammoniumsulfat bis zu 100 % Sättigung gefällten periplasmatischen Proteine wurden, wie unter 3.11.2 (S. 35) beschrieben, in Ethanolamin (pH 9,4) aufgenommen und nach Dialyse auf die Chromatofokussierungssäule aufgetragen. Man eluierte mit Polybuffer 96, pH 7,0. Der Verlauf der Reinigung ist in Tab. 6 wiedergegeben.

Tab. 6: Reinigung der periplasmatischen Asparaginase aus *P. fluorescens* (WT)

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Aktivitäts- Ausbeute (%)	Anrei- cherung
Osmotischer Schock	25	12	0,5	100	1
Ammoniumsulfat- Fällung	18	8	0,44	66	0,88
Chromatofokussierung	(0,08)	2	(25)	17	50

Das Elutionsprofil ist in Abb. 14 dargestellt. Die Asparaginase eluierte bei einem pH-Wert von 8,65 und hat in der SDS-PAGE eine scheinbare Masse von 38 kDa (Abb. 15).

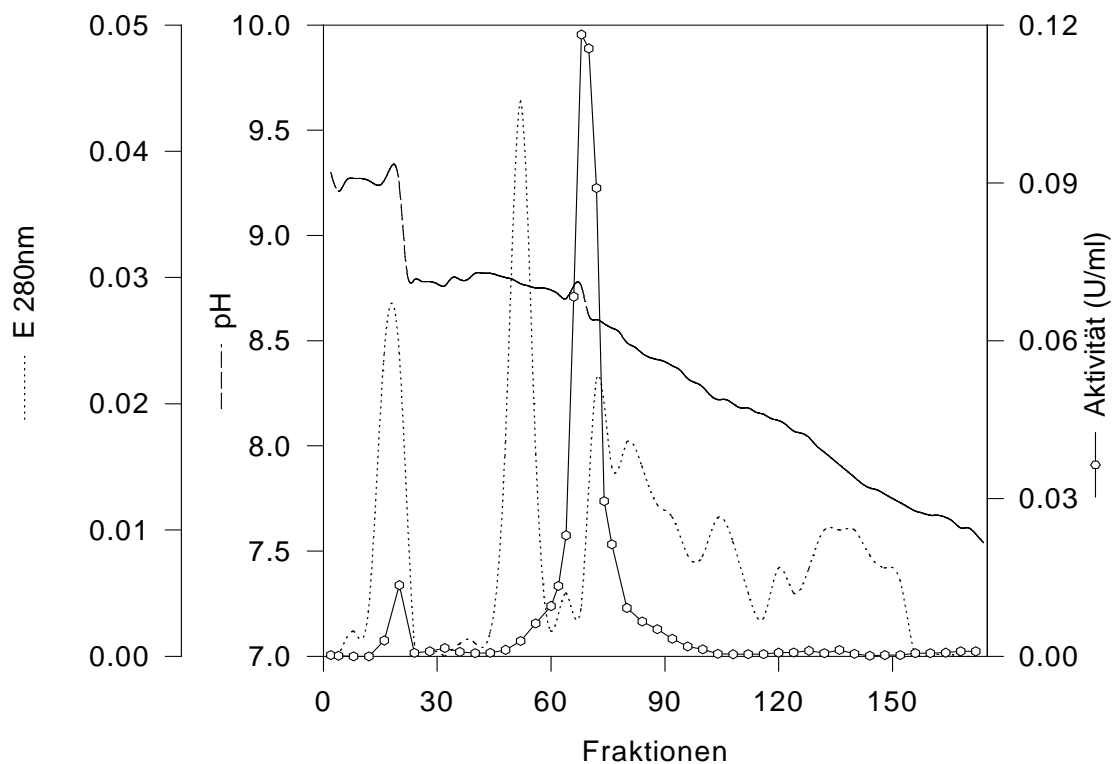


Abb. 14: Elutionsprofil einer Chromatofokussierung der periplasmatischen Asparaginase aus *P. fluorescens* (WT). Dargestellt sind die Extinktion bei 280 nm (Proteingehalt), der pH-Wert jeder zweiten Fraktion sowie die Volumenaktivität der Asparaginase, die mit dem Asparaginanalogon AHA bestimmt wurde (vgl. 3.3.2)

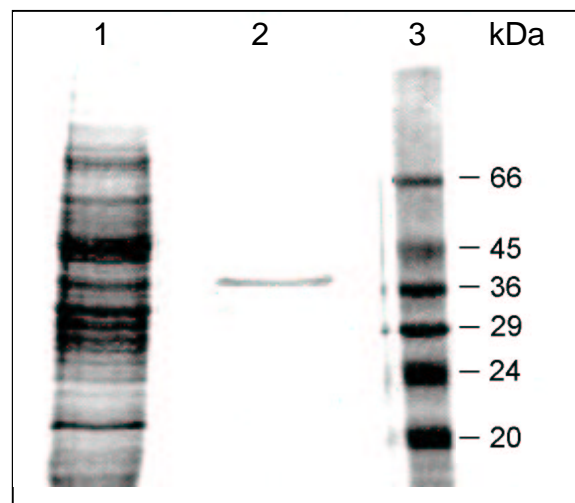


Abb. 15: Coomassie-Färbung eines SDS-Gels: 1: periplasmatische Proteine nach osmotischem Schock, 2: gereinigte PfGA und 3: Marker

Zwar waren die Ausbeuten an Protein das bis zu Homogenität gereinigt wurde nur sehr gering, zum Zweck der weiteren Untersuchungen aber ausreichend, weshalb die Reinigung nicht optimiert wurde. Bis zu 30% der auf die Chromatofokussierungssäule aufgetragenen Aktivität eluierte in der NaCl-Fraktion, mit der Restprotein von der Säule gespült wurde. Da die Eigenschaften dieses Enzyms mit denen einer Amidohydrolase

übereinstimmten, die später aus dem Cytosol angereichert werden konnte, könnte dies auf eine partieller Lyse der Zellen beim osmotischen Schock zurückzuführen sein, wodurch cytosolisches Enzym freigesetzt wird. Allerdings änderten auch die Versuche die Bedingungen des osmotischen Schocks, z.B. durch Resuspendieren des Pellets in 50 mM MES statt H₂O „schonender“ durchzuführen, an dieser Tatsache nichts.

Das periplasmatische Enzym wurde mit Hilfe des gekoppelten Enzymtests (siehe 3.3.1, S. 20) auf seine Substratspezifität hin untersucht. Es setzt neben L-Asparagin auch D-Asparagin und L-Glutamin um (siehe Tab. 7). Das Protein wurde mittels „Semi-Dry-Verfahren“ auf eine PVDF-Membran transferiert und die ersten 10 Aminosäuren N-terminal sequenziert (siehe 3.9, S. 28). Die Sequenzierung ergab die folgende N-terminale Aminosäuresequenz:

KEVETKTKLA . . .

Diese Sequenz entspricht genau der Sequenz der ersten zehn Aminosäuren, die von der DNA-Sequenz des aus *P. fluorescens* (WT) klonierten *ansB*-Gens abgeleitet wurde [Hüser *et al.* 1999]. In Anlehnung an eine von Roberts [1976] aus dem Bakterienstamm *P. fluorescens* 7A isolierte Amidohydrolase, die ebenfalls neben L-Asn auch L-Gln umsetzt und mit PGA für *Pseudomonas*-Glutaminase-Asparaginase benannt ist, wurde das hier gereinigte Enzym als PfGA, für *Pseudomonas fluorescens*-Glutaminase-Asparaginase, bezeichnet.

Die aus der Zellseparation erhaltenen cytosolischen Proteine wurden ebenfalls einer Chromatofokussierung unterzogen. In einem pH-Bereich von 9 –7,4 wurde jedoch keine Aktivität des Enzyms gefunden. Die gesamte Aktivität war in der NaCl-Fraktion, mit dem Restproteine von der Säule eluiert wurden.

Mit Hilfe einer FPLC-Anionenaustauschchromatographie über Mono-Q mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M konnte die cytosolische Asparaginase zwar weiter angereichert, aber nicht bis zur Homogenität gereinigt werden. Eine Bestimmung der Substratspezifität ergab, daß das aus dem Cytosol angereicherte Enzym fast ausschließlich L-Asparagin umsetzt (Tab. 7). Es wurde deshalb mit PfA für *Pseudomonas fluorescens*-Asparaginase bezeichnet.

Von beiden Enzymen wurde der K_m-Wert bestimmt (Abb. 16), als Substrat diente dabei das Asparaginanaloge AHA.

Die PfGA zeigt einen etwa 10-fach niedrigeren K_m-Wert als das cytosolische Enzym und besitzt damit eine deutlich höhere Substrataffinität.

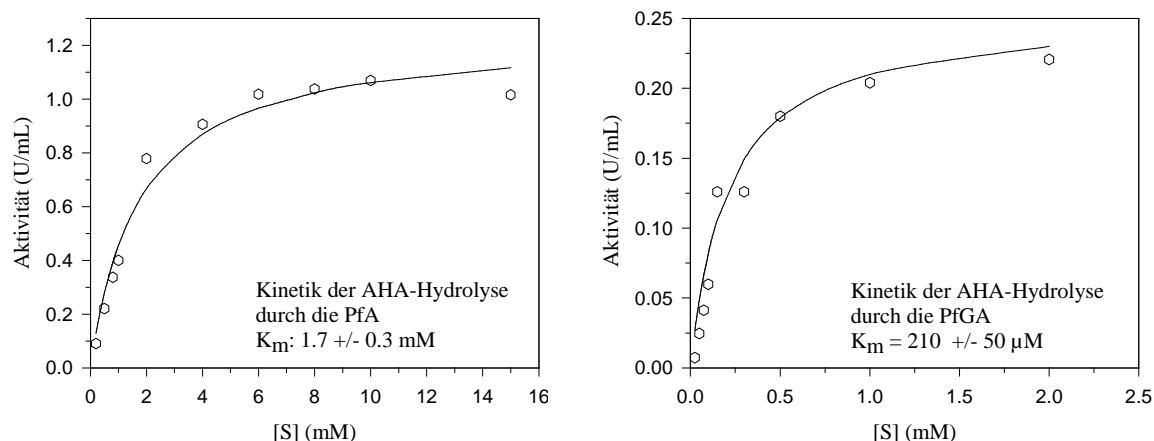


Abb. 16: Kinetik der AHA-Hydrolyse durch die PfA und die PfGA. Für die K_m -Wert Bestimmung wurden je 600 µl Puffer-Substratlösung verschiedener Konzentrationen vorgelegt und die Reaktion durch die Zugabe von 10 µL Enzymlösung gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden je 100 µL des Reaktionsgemischs zum Abstoppen der Reaktion auf 25 µL TCA gegeben und nach Zugabe der Oxinlösung die Extinktion bei 705 nm gemessen (vgl. 3.3.2, S. 21). Die für die verschiedene Substratkonzentrationen ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Isoenzymen besteht darin, daß die cytosolische Asparaginase durch das SH-Reagenz p-Chloromercuribenzoat (pCMB) bei einer Konzentration des Hemmstoffs von 0,6 mM fast vollständig hemmbar ist, während die periplasmatische Aktivität kaum beeinflusst wird.

Die Eigenschaften der beiden Enzyme sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 7: Eigenschaften der PfGA und der PfA aus *P. fluorescens* (WT). Die Bestimmung der relativen Geschwindigkeit der Umsetzung von L-Asn, D-Asn und L-Gln erfolgte mit dem gekoppelten Enzymtest (vgl. 3.3.1). Die Hemmung der Enzymaktivität wurde anhand der Umsetzung des Substratanalogons AHA gemessen (vgl. 3.3.2), wobei die Konzentration des Hemmstoffes pCMB 0,6 mM betrug.

	Asparaginase Periplasma (PfGA)	Asparaginase Cytosol (PfA)
Hemmung durch pCMB	< 20 %	> 90 %
Umsetzung von:		
L-Asn	100 %	100 %
D-Asn	40 %	0,6 %
L-Gln	150 %	2,5 %
K_m -Wert	210 µM	1,7 mM

4.5 Analyse von differentiell exprimierten Proteinen durch zweidimensionale Gelelektrophorese

4.5.1 Differentielle Expression von Proteinen des Bakteriums *P. fluorescens* (WT) bei Wachstum auf den Medien M9-Asn und M9-Glc/NH₄⁺

Um zu untersuchen, ob bei Wachstum auf Asparagin als einziger N- und C-Quelle in *P. fluorescens* (WT) neben der periplasmatischen Asparaginase weitere Enzyme induziert werden, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Völker (Max-Planck Institut, Marburg) die zweidimensionale Proteingelelektrophorese angewandt. Zur Isolierung von differentiell exprimierten Proteinen wurde *P. fluorescens* (WT) zum einen in M9-Asn10, zum anderen eine zweite Kultur in M9-Glc/NH₄⁺ (je 10 mM), inkubiert. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in Proteinextraktionspuffer resuspendiert. Nach Ultraschallaufschluß wurden die Konzentrationen der Proteinlösungen nach der Methode von Bradford [1976] bestimmt. Für Silbergele wurden 100 µg, für Coomassie-Färbung 400 µg Gesamtzellprotein aufgetragen und mittels 2D-Proteingelelektrophorese getrennt (Abb. 17).

Die mit roten Pfeilen markierten Proteine werden mit Asparagin als einziger N- und C-Quelle stärker exprimiert. Da sowohl die Masse als auch der isoelektrische Punkt (38 kDa, IEP=8,6) der PfGA bekannt sind, wurden die Proteinspots 1, 2, und 3 aus dem Gel ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau massenspektroskopisch untersucht. Die proteolytische Spaltung des Proteins bewirkt eine kontrollierte Fragmentierung in kleinere Peptide. Dies resultiert in einem Peakmuster im Massenspektrum, das für das verdaute Enzym charakteristisch ist. Da die Proteinsequenz der PfGA bekannt ist [Hüser *et al.*, 1999] konnten die Schnittstellen, die durch einen tryptischen Verdau im Protein entstehen ermittelt und damit auch die Massen der zu erwartenden Fragmente berechnet werden. Aufgrund dieser Tatsachen konnte der mit 1 bezeichnete Proteinspot durch die massenspektroskopischen Untersuchungen als die PfGA identifiziert werden.

Deutlich ist anhand der Gele erkennbar, daß in M9-Glc/ NH_4^+ andere Proteinspots hervortreten, die in M9-Asn nicht erkennbar sind (Markierung mit blauen Pfeilen).

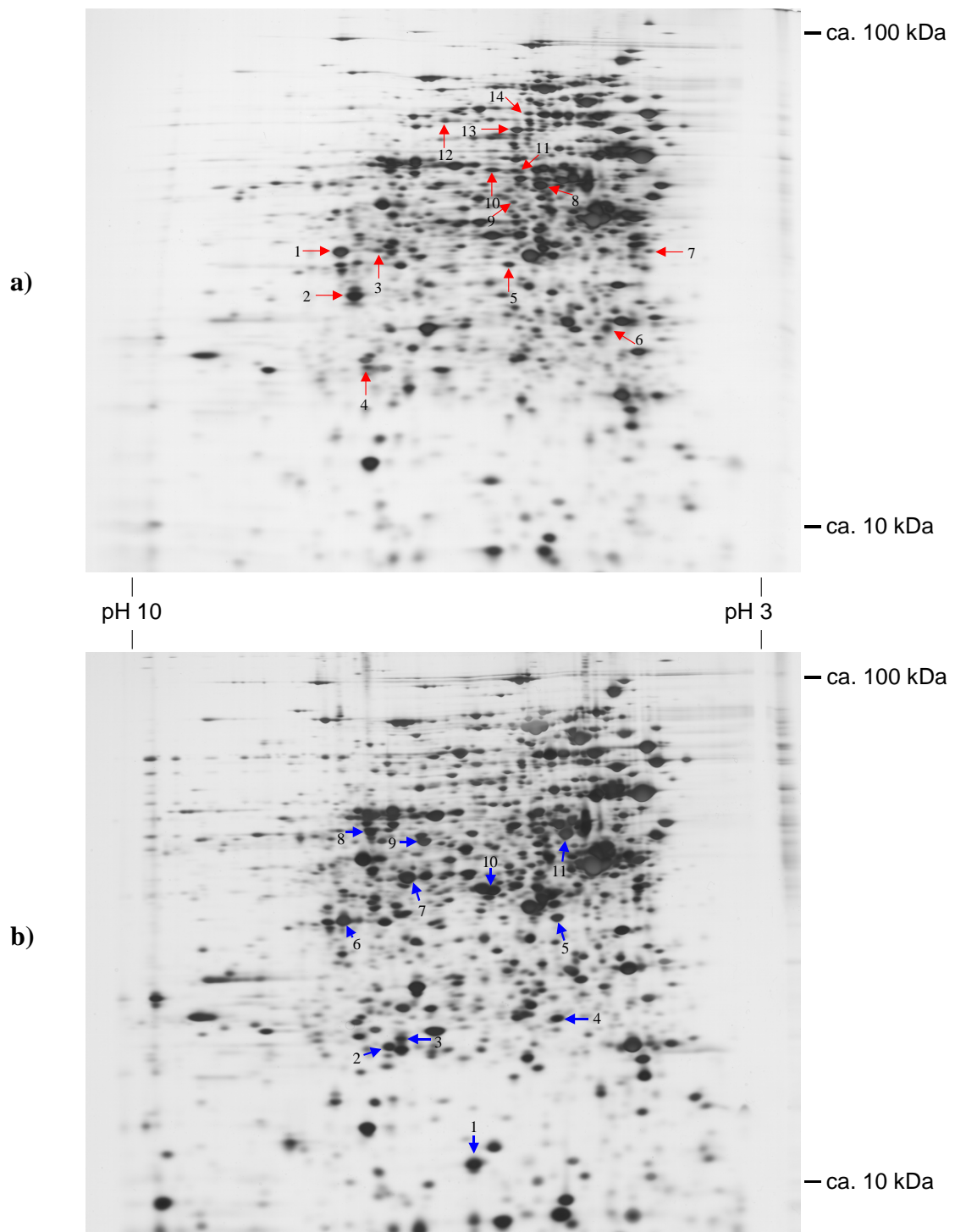


Abb. 17: 2D-Proteingelelektrophorese von Gesamtzellproteinextrakten (100 μg) aus *P. fluorescens* (WT)-Kulturen. Die Zellen wurden in M9-Medium mit a) Asn oder b) Glucose und NH_4Cl (je 10 mM) in der logarithmischen Phase geerntet. Proteinspots die unter a) aber nicht unter b) auftreten sind rot markiert; dabei handelt es sich bei Spot Nummer 1 um die PfGA. Proteine die unter Glucose/ NH_4Cl induziert werden sind mit blauen Pfeilen markiert.

4.5.2 Induktion und Repression der PfGA unter verschiedenen Kulturbedingungen

Unter den in 4.5.1 beschriebenen Bedingungen wurden weitere 2D-Gele von Proteinextrakten angefertigt bei denen die Zellen in M9-Medium mit Aspartat sowie Asparagin und Fumarat (je 10 mM) gewachsen waren. Abb. 18a-d zeigt Ausschnitte dieser Gele, aus denen die Induktions-/Repressionseffekte auf die PfGA deutlich werden.

In Anwesenheit von Glucose und Ammoniumchlorid (Abb. 18a) ist die PfGA fast vollständig reprimiert. Eine Induktion des Enzyms ist sowohl mit Asparagin (Abb. 18b) als auch Aspartat (Abb. 18c) als einziger N- und C-Quelle zu erkennen. Unter Angebot von Asparagin und Fumarat (Abb. 18d) ist der entsprechende Proteinspot im Vergleich zu Abb. 18b und c zwar schwächer, es ist aber eine Induktion erkennbar. Unter der gleichen Induktions- und Repressionskontrolle wie die PfGA scheint das mit 2 bezeichnete Protein zu stehen.

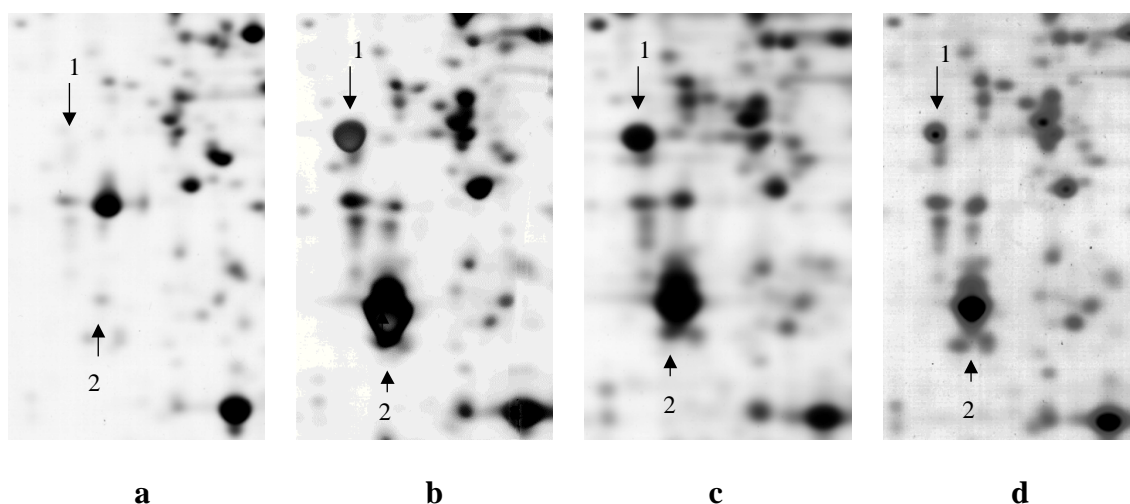


Abb. 18: Ausschnitte aus 2D-Proteingelen von Gesamtzellextrakten von *P. fluorescens* (WT) unter verschiedenen Induktionsbedingungen. Als C- und N-Quelle dienten a) Glucose, NH_4Cl , b) Asn, c) Asp, d) Asn+Fumarat (Endkonzentration im Medium je 10 mM). Der mit der Nummer 1 bezeichnete Proteinspot kennzeichnet die PfGA.

„Protein 2“ wurde aus dem Gel ausgeschnitten und N-terminal sequenziert. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms MultAlin [Corpet, 1988] und den Datenbanken SWISSProt und EMBL durchgeführt. In Abb. 19 ist der Sequenzvergleich von „Protein 2“ mit einem Glutamin-Bindeprotein aus *Bacillus stearothermophilus* [Wu und Welker, 1991] und einem vermuteten Glutamin-Bindeprotein aus *Rhodospirillum rubrum* dargestellt. Letzteres zeigt große Ähnlichkeiten zu Glutamin-Bindeproteinen wie GlnH, BztA und YbeJ [Zhang *et al.*, 1997].

	1	10	20	30
	----- ----- ----- -----			
<i>B. stearothermophilus</i>	MKRKTVW	KIWI	TLALIALLS	SITAGCSSESSTTN
<i>R. rubrum</i>				MSFKHVVALAAAFG
<i>P. fluorescens</i> (WT), „Protein 2“				
	40	50	60	70
	---- ----- ----- -----			
<i>B. stearothermophilus</i>	KEDGAK	STETSAGT	NTLEKIKR	GKLIVGVKYDLN
<i>R. rubrum</i>	LLAGSASA	EELTGT--	LKKIKETGE	IATGHRDSSI
<i>P. fluorescens</i> (WT), „Protein 2“		AELTGT--	LKKINDXGT	

Abb. 19: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von Protein 2 (vgl. Abb. 17a, Abb. 18b-d) aus *P. fluorescens* (WT) mit einem Glutamin-Bindeprotein aus *Bacillus stearothermophilus* [Wu und Welker, 1991] und einem Protein aus *Rhodospirillum rubrum*, das große Ähnlichkeiten zu Glutamin-Bindeproteinen wie GlnH, BztA und YbeJ aufweist [Zhang *et al.*, 1997].

Die ersten Aminosäuren der Sequenzen von *B. stearothermophilus* und *R. rubrum* sind basische Aminosäuren, die typisch für periplasmatische Signalpeptide sind. Die Sequenzvergleiche deuten darauf hin, daß „Protein 2“ von *P. fluorescens* (Abb. 18b-d) ebenfalls ein Glutamin-Bindeprotein sein könnte.

4.5.3 σ^{54} -abhängige Induktion von Proteinen des Bakteriums *P. putida* KT2440

Für *P. fluorescens* (WT) ist die DNA-Sequenz sowie der Promotorbereich des für die PfGA kodierenden Gens (*ansB*-Gen) bekannt. In stromaufwärts liegenden DNA-Bereichen wurden bei den Basen –24 und –12 invariante GG- und GC-Motive gefunden, die auf einen σ^{54} -abhängigen Promotor des *ansB*-Gens hinweisen [Hüser, 1999]. Ein

unmittelbarer Beweis für eine σ^{54} -abhängige Expression des *ansB*-Gens wäre durch Aktivitätsuntersuchungen an einer σ^{54} -defizienten Mutante möglich.

Da von *P. fluorescens* (WT) keine σ^{54} -Mutante verfügbar war, wurden entsprechende Versuche mit einer in der Literatur beschriebenen σ^{54} -Mutante des Bakterienstammes *P. putida* KT2440 durchgeführt [Köhler *et al.*, 1989]. Dies schien deshalb gerechtfertigt, weil durch Aktivitätsbestimmungen der PfGA des Wildtypstammes von *P. putida* KT2440 und *P. fluorescens* (WT) vergleichbare Eigenschaften beider Enzyme bewiesen werden konnten: wie das Enzym aus *P. fluorescens* (WT), wurde die PsGA aus *P. putida* KT2440 auf Asn, Asp und Glu als einziger C- und N-Quelle stark induziert, hingegen war in M9-Glc/NH₄⁺ kaum Aktivität nachweisbar [Hüser, 1999].

Von Interesse war zum einen, ob das der PfGA entsprechende Enzym aus *P. putida* in der Mutante nicht mehr nachweisbar ist und zum anderen, wieviele weitere Proteine unter induzierenden Bedingungen im WT, nicht aber in der σ^{54} -defizienten Mutante zu identifizieren sind. Hierfür wurde wiederum die 2D-Proteingelelektrophorese angewandt. Bakterienzellen des Wildtypstammes von *P. putida* KT2440 wurden in M9-Glu bzw. M9-Glc/NH₄⁺, die σ^{54} -Mutante von *P. putida* KT2440 auf Glu als einziger C- und N-Quelle angezogen. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase geerntet. Es wurden je 100 µg Gesamtzellproteinextrakt mittels 2D-Proteingelelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 20. Proteinspots die bei Wachstum des Wildtyps auf Glu, nicht aber bei Wachstum der Mutanten auf Glu erkennbar sind, wurden mit einem roten Pfeil markiert (Abb. 20a, b). Die Expression dieser Enzyme sollte ebenfalls in Abhängigkeit eines σ^{54} -Faktors erfolgen. Da die DNA-Sequenz der Asparaginase aus *P. putida* KT2440 nicht bekannt ist, läßt sich das Enzym im Gel zwar nicht eindeutig zuordnen, da Masse und IEP der PsGA aber ähnlich sein sollten, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei Spot 1 um ein der PfGA entsprechendes Enzym handelt.

Abb. 21a, b zeigt 2D-Gele eines Gesamtzellproteinextraktes von *P. putida* KT2440 (WT) bei Wachstum auf M9-Glu bzw. M9-Glc/NH₄Cl. Zum Vergleich von Induktion und Repression bei Wachstum auf Glu (Abb. 21a) bzw. Glucose/NH₄Cl (Abb. 21b) wurden Spots die nur unter Glu hervortraten mit roten Pfeilen markiert. Enzyme, die unter Glucose/NH₄Cl stärker erkennbar sind kennzeichnet ein blauer Pfeil. Wie bei *P. fluorescens* (WT) ist auch hier eine Anzahl unter Glu und Glucose/NH₄Cl differentiell exprimierter Proteine zu erkennen.

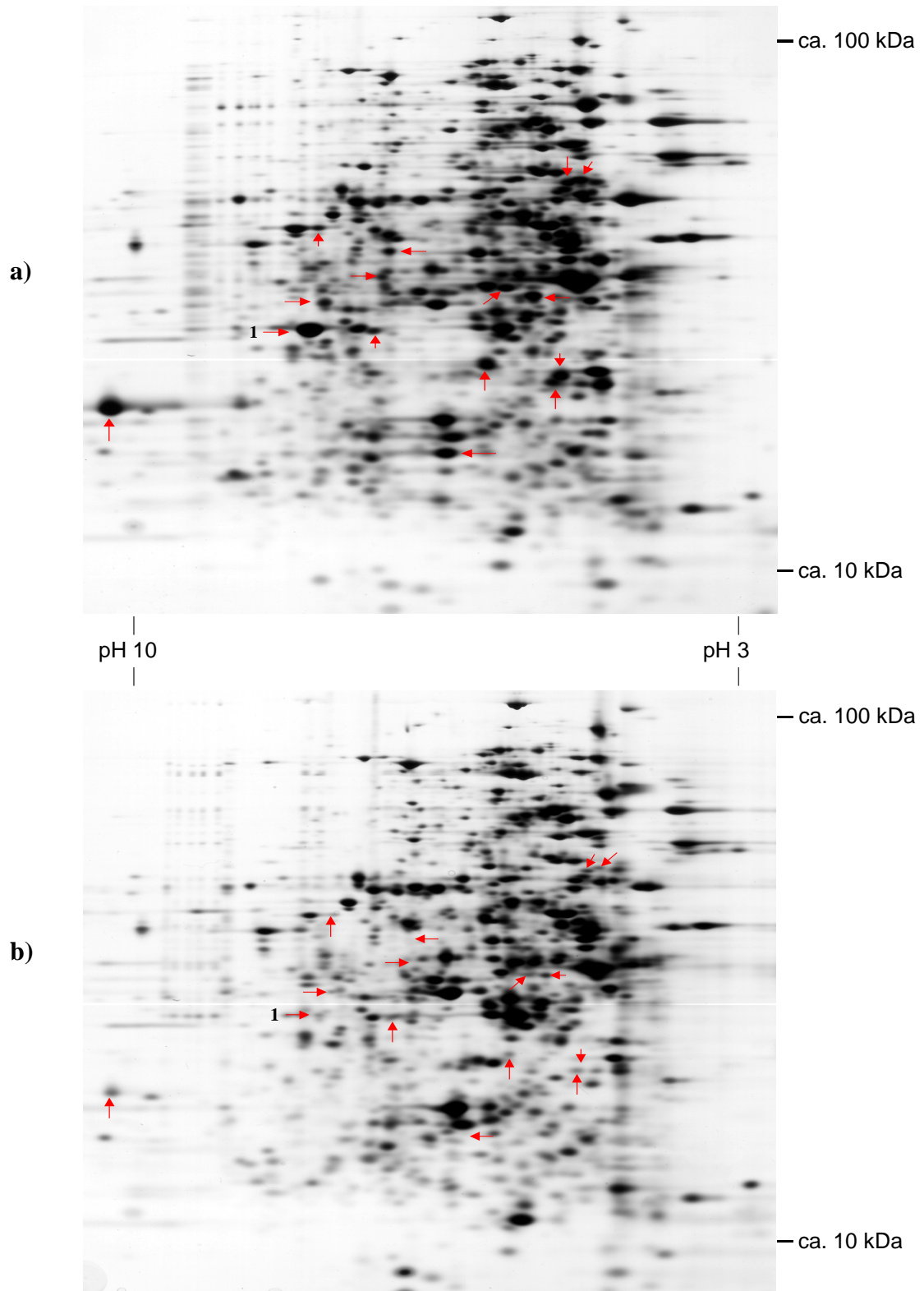


Abb. 20: 2D-Gelelektrophorese von *P. putida* KT2440. Das obere Gel zeigt die Proteine des Wildtyps, das untere Gel die Proteine der σ^{54} -Mutante bei Wachstum auf M9-Medium mit Glutamat als einziger C- und N-Quelle. Mit den roten Pfeilen sind differntiell exprimierte Proteine gekennzeichnet. 1: Vermutlich ein der PfGA entsprechendes Enzym.

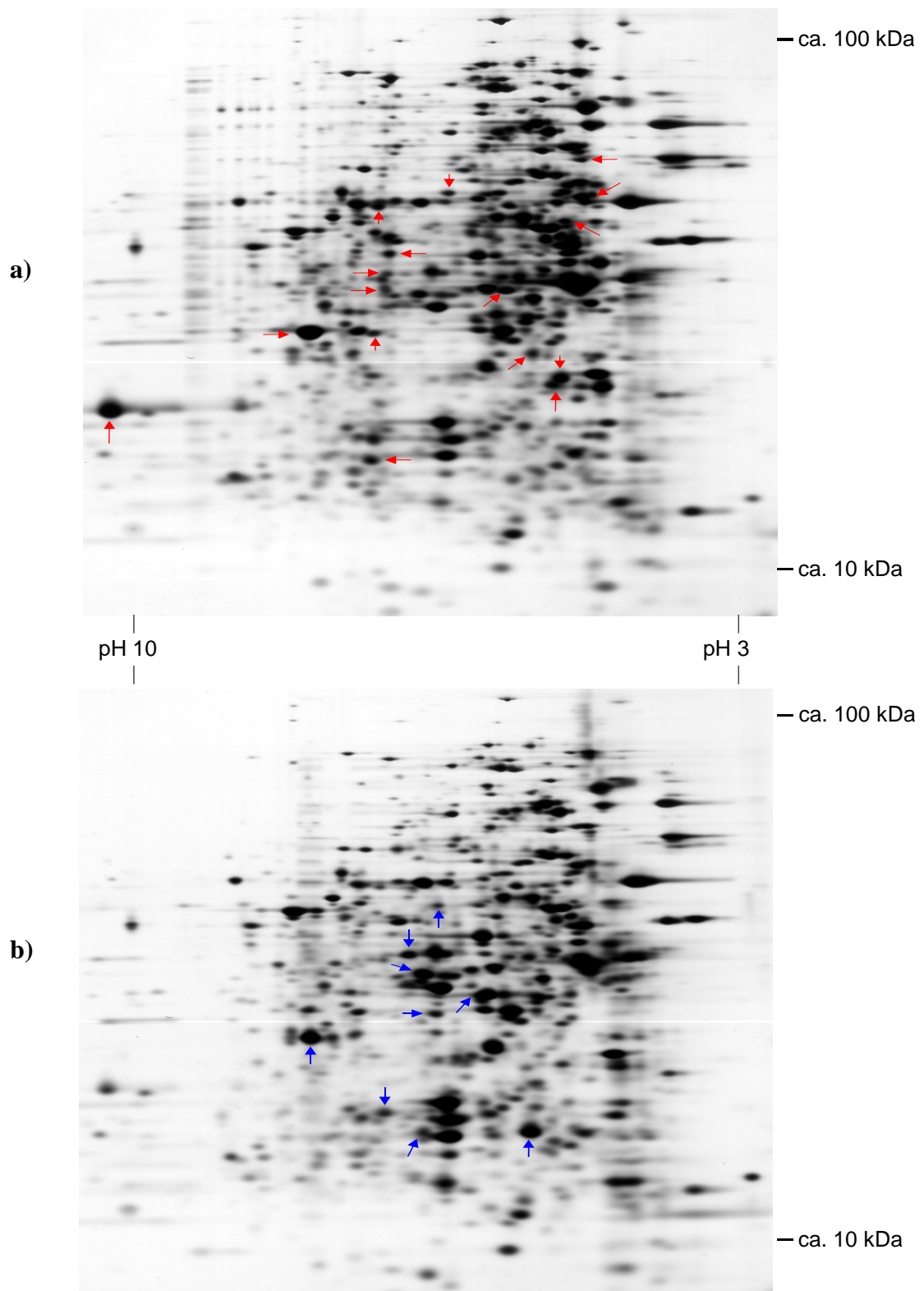


Abb. 21: 2D-Proteingele von Gesamtzellextrakten des Bakteriums *P. putida* KT2440 (WT). Die Zellen wuchsen in M9-Medium mit a) Glu und b) NH₄Cl/Glucose als N- und C-Quelle. Proteine die in a), nicht aber in b) zu erkennen sind wurden mit roten Pfeilen markiert. Proteine die in Anwesenheit von NH₄Cl/Glucose, nicht aber Glu exprimiert wurden sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

4.6 Analyse von Wurzelexsudaten

Um das Vorkommen von Aminosäuren in Wurzelexsudaten reproduzierbar bestimmen zu können, ist es notwendig, Pflanzen unter sterilen Bedingungen zu kultivieren. Zu diesem Zweck wurde ein Kulturgefäß verwendet, in dem die Pflanzennährlösung unter sterilen Bedingungen zugegeben, bzw. Exsudatproben entnommen werden konnten. Auf diese Weise wuchsen die Pflanzen über Zeiträume von über drei Monaten ohne Schimmel- oder Bakterienbefall und zeigten eine gute Wurzelbildung.

Zum Ankeimen wurden die Samen von Weizen, Gerste und Reis unter sterilen Bedingungen auf Hefeagarplatten zum Keimen gebracht. Nach etwa einer Woche konnten die Keimlinge in die Kulturgefäße überführt werden (siehe 3.12.1, S. 36). Um

möglichst natürliche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde auf erhöhte Umgebungstemperatur und zusätzliche Beleuchtung verzichtet.

Nach verschiedenen Wachstumszeiten wurden Wurzelexsudate der Pflanzen entnommen, wobei die Sterilität der Lösung durch Ausstreichen auf Agarplatten überprüft wurde. Die Exsudate wurden unmittelbar nach der Probennahme bis zur Trockne eingengt und dann bis zur weiteren Verwertung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Aminosäuren wurden

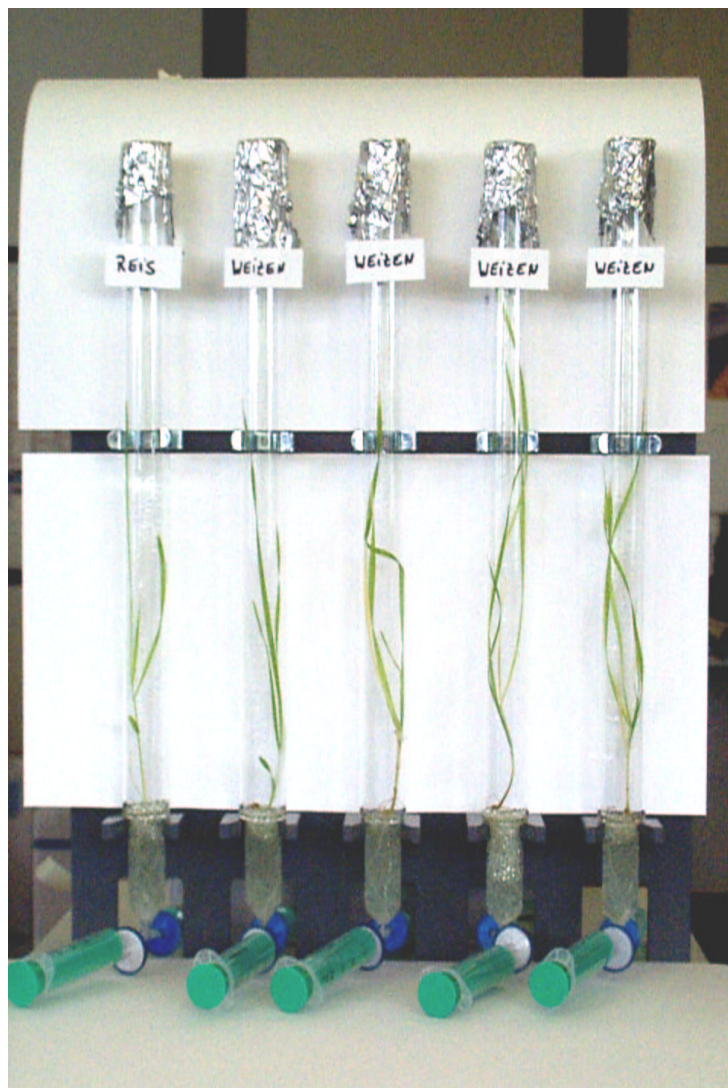


Abb. 22: Kulturgefäß mit etwa 4 Wochen alten Keimlingen von Reis und Weizen (vgl. Kap. 3.12.1, S. 36)

wie in 3.12.2 beschrieben durch Behandlung der Exsudate mit dem Kationenaustauschermaterial AG50 WX-8 isoliert. Diese zusätzliche Aufarbeitung der Proben war notwendig, da durch das Vorhandensein von zweiwertigen Metallionen im Hoagland-Medium eine Derivatisierung von Asp und Glu durch Komplexbildung verhindert wurde (vgl. Abb. 23). Außerdem konnten auf diese Weise Verunreinigungen aus dem Hoagland-Medium abgetrennt werden, deren Signale im Chromatogramm eine Zuordnung der Peaks erschwerte.

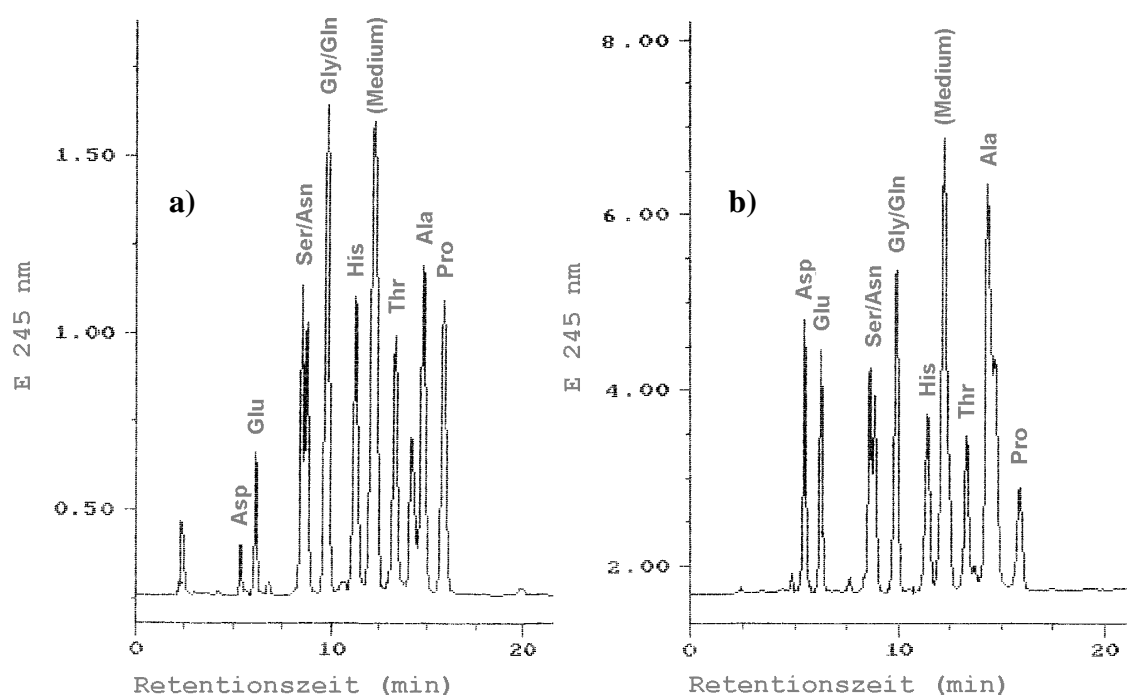


Abb. 23: Chromatogramme von Aminosäuretestgemisch: a) Aminosäuretestgemisch, gelöst in Hoagland-Medium b) Aminosäuretestgemisch gelöst in Hoagland-Medium nach Behandlung der Probe mit dem Kationenaustauschermaterial AG50WX-8; jeder Peak entspricht hier 25 nmol an Aminosäure.

Nach Derivatisierung der Aminosäuren mit PITC wurden die Exsudate durch HPLC analysiert. Zunächst ergab sich für die Quantifizierung der Aminosäuren Ser und Asn sowie Gly und Gln ein Problem, da sich die entsprechenden Peaks überlagerten und somit eine Konzentrationsberechnung der einzelnen Aminosäuren unmöglich wurde (vgl. Abb. 23). Durch die Optimierung des Elutionsgradienten konnte jedoch die Trennung der genannten Aminosäuren deutlich verbessert werden, vgl. Abb. 24b.

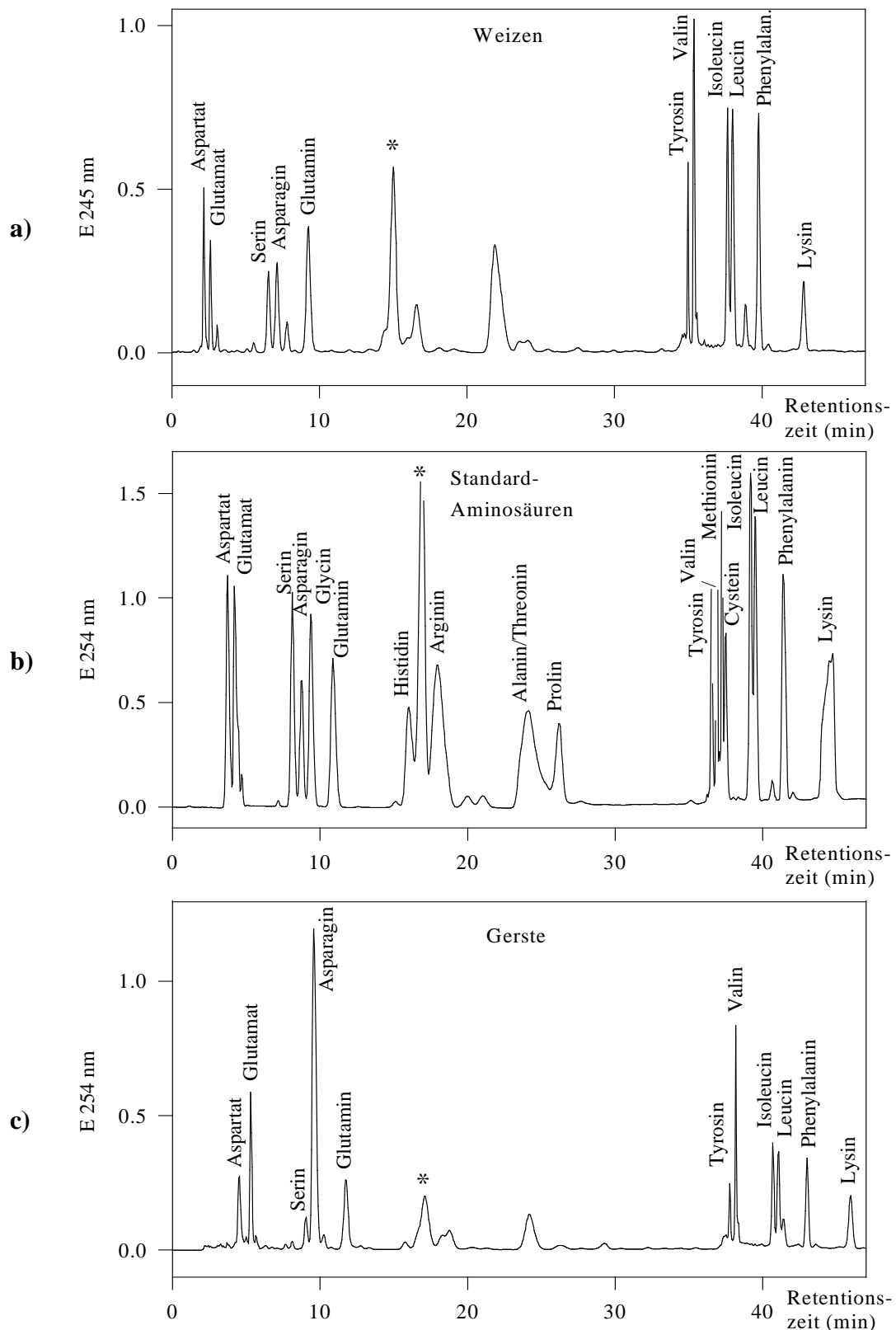


Abb. 24a, c: Chromatogramm zweier Wurzelexsudate von Weizen (oben) und Gerste (unten). Die Flüssigkeit wurde nach 50 Tagen Pflanzenwachstum entnommen. Die Proben wurden wie unter 3.12.2 (S. 37) beschrieben aufgearbeitet und die Aminosäuren mit PITC derivatisiert. Die Elution erfolgte mit dem unter 3.12.3 angegebenen Gradienten.

Abb. 24b: Chromatogramm eines Standardgemisches von Aminosäuren. Die Probe wurde wie die Exsudatproben aufgearbeitet und gemessen. Der Peak bei etwa 17 min stammt von Verunreinigungen im Hoagland- Medium (*).

Die Zuordnung der Aminosäuren erfolgte durch Vergleich der Elutionsprofile mit denen von Standardgemischen und dem Mischen von Standard-Aminosäuren mit Exsudatproben.

Zur Quantifizierung diente ein Standardgemisch von Aminosäuren, welches wie die Exsudate behandelt wurde um Verluste während der Aufarbeitung der Proben zu berücksichtigen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Peak-Fit. Die Graphen in Abb. 24 auf der vorhergehenden Seite zeigen drei Chromatogramme mit einer typischen Verteilung der Aminosäuren der Exsudate von Weizen, Gerste sowie den Aminosäurestandard. Die Menge an Aminosäure pro Wurzel berechnet sich aus den Peaks der einzelnen HPLC-Messungen. Bezugsgrößen sind die entsprechenden Integrale der Messungen des Standard-Aminosäuregemisches.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Konzentration der Aminosäuren in der Rhizosphäre wie bei Simons *et al.* [1997] abgeschätzt. Der Berechnung liegt die Annahme zugrunde, daß die durchschnittliche Wurzellänge 60 mm beträgt und die Wurzel einen Durchmesser von etwa 1 mm hat. Die Ausdehnung der Rhizosphäre wurde ebenfalls mit 1 mm angenommen. Damit errechnet sich ein Wurzelvolumen von $60 \text{ mm} \cdot \pi \cdot (0,5 \text{ mm})^2 = 47 \text{ }\mu\text{L}$. Wurzel und Rhizosphäre beanspruchen ein Volumen von $60 \text{ mm} \cdot \pi \cdot (1,5 \text{ mm})^2 = 282 \text{ }\mu\text{L}$. Damit beträgt das Volumen der Rhizosphäre etwa $282 \text{ }\mu\text{L} - 47 \text{ }\mu\text{L} = 235 \text{ }\mu\text{L}$ und bei durchschnittlich drei Wurzeln pro Pflanze etwa $700 \text{ }\mu\text{L}$. Wenn angenommen wird, daß sich die Aminosäuren ausschließlich in der Rhizosphäre befinden, lassen sich so aus den Werten für Stoffmenge und Rhizosphärenvolumen ungefähre Konzentrationen berechnen. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Aufgeführt werden die abgegebene Stoffmenge an Aminosäuren pro Pflanze (Spalte 1), die nach der oben beschriebenen Berechnung abgeschätzte Konzentration von Aminosäuren in der Rhizosphäre (Spalte 2) sowie die relative Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren. Dabei wurde die ermittelte Gesamtmenge auf 100 % gesetzt.

Tab. 8: Ermittelte Stoffmenge verschiedener Aminosäuren pro Pflanzenwurzel, geschätzte Konzentrationen der Aminosäuren in der Rhizosphäre und Anteil an der ermittelten Gesamtmenge der nachgewiesenen Aminosäuren in %.

Aminosäure	Stoffmenge pro Wurzel [nmol]			Geschätzte Konz. in der Rhizosphäre [μ M]			Anteil am Gesamtamino-säurevorkommen [%]		
	Weizen	Gerste	Reis	Weizen	Gerste	Reis	Weizen	Gerste	Reis
Asparagin	140	175	101	200	250	144	22,8	32,7	31,0
Aspartat	34	65	22	49	93	32	5,6	12,2	6,9
Glutamin	84	14	27	120	20	38	13,7	2,6	8,2
Glutamat	55	106	31	79	152	44	9,0	19,9	9,5
Serin	25	5	8	36	7	12	4,1	0,9	2,6
Glycin	10	--	10	14	--	14	1,6	--	3,0
Threonin	20	--	--	28	--	--	3,2	--	--
Alanin	50	--	--	72	--	--	8,2	--	--
Prolin	12	23	--	17	33	--	1,9	4,3	--
Tyrosin	16	17	22	23	25	32	2,6	3,3	6,9
Valin	67	41	31	96	59	44	10,9	7,7	9,5
Isoleucin	34	23	15	49	33	21	5,6	4,3	4,5
Leucin	36	23	20	52	33	29	5,9	4,3	6,3
Phenylalanin	24	12	10	34	17	14	3,9	2,2	3,0
Lysin	7	29	28	10	42	40	1,1	5,5	8,6

Die Aminosäuren Cystein und Methionin konnten nicht oder in nur sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch Glycin, Prolin und Tyrosin waren nur gering konzentriert. Für Histidin, Arginin, Threonin, Alanin und Prolin war die Zuordnung aufgrund schlechter Auflösung in diesem Bereich und teilweiser Überlagerung uneindeutig oder nicht möglich. Die in Tab. 8 angegebenen Daten sind Durchschnittswerte aus vier bis sechs Chromatogrammen. In anderen Chromatogrammen war z.T. die Konzentrationen des gesamten Aminosäurespektrums wesentlich geringer oder unter der Nachweisgrenze. Immer in verhältnismäßig hohen Konzentrationen sind die Aminosäuren Asp, Glu, Asn, Gln, Val, Leu und Ile vorhanden.

5 DISKUSSION

Pflanzen geben bis zu 40 % der in die Wurzel gelangenden Photosyntheseprodukte durch Exsudation in den Boden ab. Bei diesen Exsudaten handelt es sich um pflanzliche Stoffwechselprodukte mit einem hohen Anteil an Zuckern und Aminosäuren [Lynch und Whipps, 1990], die von Mikroorganismen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden können. Eine besonders effiziente Verwertung dieser Nährstoffe bietet den Rhizosphärenbakterien einen Selektionsvorteil gegenüber weniger angepaßten Konkurrenten. Ein Beispiel hierfür ist die bereits genannte Fähigkeit vieler Bakterien, unter wachstumslimitierenden Eisenkonzentrationen Siderophore auszubilden und damit Eisen in ausreichender Menge verfügbar zu machen [O'Sullivan und O'Gara, 1992]. Die Defizienz bestimmter Eigenschaften konnte bereits mit einer verminderten Überlebensrate bzw. Wurzelbesiedlung in Zusammenhang gebracht werden. Hierzu gehören z.B. Eigenschaften wie Beweglichkeit [de Weger *et al.*, 1987], Chemotaxis [Gamliel und Katan, 1992], die Produktion O-antigener Seitenketten von Polysacchariden [de Weger *et al.*, 1989], die Fähigkeit zur Synthese von Vitamin B₁ sowie eine hohe bakterielle Wachstumsrate [Simons *et al.*, 1996].

Bisher nicht beantwortet ist die Frage, ob die Fähigkeit zur Verwertung von Aminosäuren einen Selektionsvorteil darstellt. Im Hinblick darauf wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie die Bakterien *P. fluorescens* und *P. putida* insbesondere die in der Rhizosphäre häufig vorkommenden Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat nutzen können, und welche Enzyme hierfür aktiviert werden.

5.1 Die Verwertung von Aminosäuren als Stickstoffquelle

Unter den stickstoffhaltigen Verbindungen in der Rhizosphäre stellen Aminosäuren einen beträchtlichen Anteil dar. So fand man in der Rhizosphäre von Mais einen Gehalt von bis zu 36 mg/kg Nitratstickstoff, 17-27 mg/kg Stickstoff aus Ammoniumionen und 0,45-220 mg Stickstoff aus Aminosäuren pro kg Bodentrockenmasse [Jones und Darrah, 1993]. Untersuchungen an Rapspflanzen in Hydrokultur gaben Hinweise darauf, daß verschiedene stickstoffreiche Aminosäuren wie Asparagin, Arginin, Glutamin und Lysin von Mikroorganismen besonders gut verwertet werden können [Shepherd und Davies, 1994]. Auch sind die häufig im Boden vorkommenden

Aminosäuren Glutamin und Glutamat in vielen Bakterien wichtige Intermediate des N-Stoffwechsels [Schreier, 1993]. Um Hinweise auf die Verwertbarkeit verschiedener Aminosäuren als N-Quelle zu erhalten, wurde zunächst das Wachstum von *P. fluorescens* (WT) in M9-Minimalmedium mit den Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat bzw. NH_4Cl als einziger N-Quelle im Medium verfolgt. Die Wachstumsraten waren bei den fünf verschiedenen N-Quellen ähnlich, die angebotenen Aminosäuren stellen also ebensogute N-Quellen dar wie Ammoniumionen. Um dies mit der Verwertbarkeit weiterer Aminosäuren zu vergleichen, wurde die Zunahme der OD_{600} der drei Bakterienstämme *P. fluorescens* (WT), *P. putida* (WT) und *P. fluorescens* Pf-5 bei Wachstum auf weiteren Aminosäuren untersucht. Es zeigte sich, daß von den N-reichen Aminosäuren mit zusätzlichem Stickstoff in der Seitenkette insbesondere Asparagin, Glutamin und Arginin besonders effizient genutzt wurden. Das Wachstum der Bakterien auf Histidin, Lysin und Tryptophan war deutlich langsamer.

Bei Anwesenheit von Aminosäuren ohne weiteres Stickstoffatom in der Seitenkette war das Wachstum auf Alanin, Serin, Aspartat und Glutamat stärker als auf Phenylalanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Cystein.

Die Gründe für die recht unterschiedliche Verwertbarkeit der Aminosäuren könnten in verschiedenen Enzymaktivitäten der Aminosäure abbauenden Enzyme, aber auch bei den entsprechenden Transportsystemen liegen. Für *P. aeruginosa* PAC1 wurde z.B. ein Defekt in der Histidinaufnahme beschrieben, durch welchen der Bakterienstamm auf Histidin als N-Quelle nur sehr langsam wachsen konnte [Nyberg und Clarke, 1978]. Möglich ist auch, daß bestimmte Aminosäuren gut in schnell verwertbare Metabolite umgesetzt werden können. Ein Beispiel hierfür ist Aspartat, das durch eine Aspartase direkt zu Fumarat abgebaut werden kann. Fumarat ist ein Intermediat des Citratcyclus und könnte so direkt als Kohlenstoffquelle genutzt werden.

Bakterien können eine Vielzahl verschiedener stickstoffhaltiger Verbindungen verwerten [Merrick und Edwards, 1995]. Anorganische Substanzen wie N_2 oder Nitrat werden zunächst in NH_4^+ -Ionen umgewandelt [Schlegel, 1992], die zumeist auch eine bevorzugte N-Quelle darstellen. Zur Verwertung der Ammoniumionen gibt es in der Regel zwei assimilatorische Wege [Merrick und Edwards, 1995]: In Enterobakterien wird bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) aktiviert. Sie katalysiert die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat. Bei niedriger Verfügbarkeit von NH_4^+ -Ionen wird das GS/GOGAT-System aktiviert. Dabei

setzt die Glutamin-Synthetase (GS) NH_4^+ -Ionen und Glutamat zu Glutamin um, die Glutamat-Synthase (GOGAT) katalysiert den Transfer der Amidgruppe von Glutamin auf α -Ketoglutarat. Dabei entstehen zwei Moleküle Glutamat (vgl. 1.6).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann das Bakterium *P. fluorescens* (WT) die Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat als alleinige N-Quelle gut nutzen. Um Hinweise über den Einfluß dieser Aminosäuren auf die Aktivitäten der drei Schlüsselenzyme des N-Stoffwechsels zu gewinnen, wurden deren Aktivitäten bei Wachstum auf den oben genannten Aminosäuren bzw. Ammoniumchlorid verglichen:

Die Aktivitäten der GDH waren unter den gegebenen Kulturbedingungen etwa gleich, die spezifischen Aktivitäten des Enzyms lagen zwischen 0,03 und 0,08 U/mg (vgl. 4.2.2). Eine etwas geringere Aktivität des Enzyms war bei Wachstum auf Glutamat und auch Glutamin erkennbar. Dies könnte damit erklärt werden, daß diese, als zentrale Intermediate des N-Stoffwechsels geltenden Aminosäuren, bereits in ausreichender Konzentration zur Verfügung standen.

Die GS zeigte in Anwesenheit der Aminosäuren mit etwa 0,2 U/mg etwa dreifach höhere Aktivitäten als bei Wachstum auf Ammoniumchlorid (ca. 0,06 U/mg), während bei der GOGAT das entgegengesetzte Verhältnis zu beobachten war. Eine gewisse Grundaktivität der GS sollte allgemein auch dann zu beobachten sein, wenn die N-Assimilation über die GDH erfolgt. Nur dann ist auch die Synthese von Glutamin gewährleistet, das als ein wichtiger N-Lieferant für weitere N-haltige Verbindungen wie Purin und Pyrimidinnucleotide sowie Nicotinamid-Derivate gilt [Schreier, 1993]. Dies könnte auch die etwas geringere Aktivität der GS auf glutaminhaltigem Medium erklären. Fraglich ist allerdings, warum die Aktivität der GS bei Wachstum auf den Aminosäuren gegenüber Wachstum auf Ammoniumchlorid verhältnismäßig hohe Werte erreicht. Interessante Daten liefern hierzu die Untersuchungen einer NADPH-abhängigen GDH des fakultativ methylo trophen Bakteriums *Pseudomonas* sp. AM1 [Bellion und Tan, 1984]. Das Bakterium ist in der Lage, Methylamin als einzige N- und C-Quelle zu nutzen. Wurde dem Bakterium eine gegenüber Methylamin bevorzugte C-Quelle zugeführt, so wurde der Stickstoff aus Methylamin hauptsächlich über die GS und Glutamin assimiliert, während nur geringe Aktivitäten einer NADPH-abhängigen GDH gemessen wurden. Wurden hingegen Ammoniumchlorid und Succinat als N-bzw. C-Quelle vorgelegt, so konnten hohe GDH-Aktivitäten nachgewiesen werden. Da in anderen methylo trophen Bakterien überhaupt keine GDH meßbar war, wurde spekuliert,

ob dieses Enzym eher den Abbau von Glutamat statt dessen Synthese katalysiert. Diese Vermutung wurde aber aufgrund des hohen K_m -Wertes für Glutamin (31,6 mM) und des niedrigen K_m -Wertes für α -Ketoglutarat (0,76 mM) sowie hohen Aktivitäten des Enzyms bei Bakterienwachstum mit NH_4^+ -Ionen als N-Quelle ausgeschlossen [Bellion und Tan, 1984]. Auch die GS des Bakteriums *P. aeruginosa* zeigt bei Wachstum auf Ammoniumchlorid die niedrigsten, bei Wachstum auf den Aminosäuren Pro und His dagegen 5-fache und höhere Aktivitäten, wenn diese Substanzen die alleinige N-Quelle sind [Brown und Tata, 1981].

Die Rolle der GOGAT ist in Pseudomonaden bisher wenig untersucht. Wie Janssen *et al.* [1981] zeigen konnten, schien ihre Aktivität nicht mit dem Anteil an aktiver GS zu korrelieren. Das entspricht soweit den in dieser Arbeit gezeigten Werten. Brown und Tata [1981] untersuchten Mutanten aus *P. aeruginosa* mit defizienten GOGAT-Aktivitäten. Die Mutanten zeigten eine verminderte Fähigkeit unter N-limitierenden NH_4^+ -Konzentrationen oder auf verschiedenen Stickstofflieferanten, darunter Nitrat, Nitrit, Harnstoff, Serin, Glycin, zu wachsen. Unbeeinträchtigt war hingegen das Wachstum der Mutanten auf Glu, Gln und Asp [Brown und Tata, 1981], was ein Indiz dafür wäre, daß Ser und Gly eher limitierende, Asn, Gln, Asp und Glu gute N-Quellen darstellen.

Im Vergleich zu den anderen drei Enzymen wurden relativ hohe Aktivitäten an Asparaginase und Glutaminase gemessen (ca. 0,3 U/mg). Die Tatsache, daß in Pseudomonaden vergleichsweise hohe L-Asparaginase bzw. L-Glutaminaseaktivitäten auftreten, wurde bereits durch Imada *et al.* [1973] beschrieben. Da die Substratspezifität der beiden Enzyme oft nicht sehr hoch ist, d.h. zum Teil sowohl Asparagin als auch Glutamin umgesetzt werden können, konnte zwischen diesen beiden Enzymen nicht eindeutig unterschieden werden. Auf die Eigenschaften dieser beiden Enzyme wird im späteren Verlauf der Diskussion noch genauer eingegangen.

Geht man davon aus, daß Glu und Gln auch in Pseudomonaden zentrale Intermediate des N-Stoffwechsels sind, so sollte der Stickstoff der jeweils genutzten N-Quelle in diesen beiden Verbindungen nachzuweisen sein. Mittels ^{15}N -NMR-spektroskopischer Untersuchungen (vgl. 4.2.3) konnte für das Bakterium *P. fluorescens* (WT) die folgenden Tatsachen gezeigt werden:

1) Sowohl der Stickstoff aus ^{15}N -markiertem Ammoniumchlorid als auch der ^{15}N -Aminostickstoff von Glutamat werden in die beiden Aminosäuren Glutamin und

Glutamat eingebaut. Beide Substanzen können also als N-Quellen genutzt werden, der Stickstoff wird dabei in die gleichen Verbindungen eingebaut.

2) Glutamin und Glutamat scheinen damit auch in *P. fluorescens* (WT) zentrale Intermediate des N-Stoffwechsels darzustellen. Weitere Kreuzpeaks deuten auf den Einbau von ^{15}N in heterocyclische Aromaten wie Purinbasen oder Nucleotide hin. Dies ergibt sich allerdings nur aus der Interpretation von ^{15}N - und Protonenspektrum. Ein eindeutiger Beweis wäre erst durch die Zugabe der vermuteten ^{15}N -markierten Substanz und resultierender Überlagerung der Signale gegeben.

5.2 Asparagin – Bedeutung als N- oder C-Quelle?

Wurden *P. putida* in M9-Minimalmedium bei vorhandener C-Quelle entweder Ammoniumchlorid oder Asparagin als N-Quelle angeboten, so nahmen die Konzentrationen im Medienüberstand sowohl von Ammoniumchlorid als auch von Asparagin im Verlauf der Kulturdauer ab (vgl. 4.3.1). Gleichzeitig wurde in dem asparaginhaltigen Medium aber eine Zunahme an NH_4^+ -Ionen gemessen, die etwa stöchiometrisch zum Verschwinden von Asparagin im Medium war. Dies war selbst dann der Fall, wenn in dem Medium neben Asparagin Ammoniumchlorid als N-Quelle vorhanden war. Die Konzentration der NH_4^+ -Ionen stieg sogar über die stöchiometrische Menge von Asparagin im Medium hinaus an. Diese Beobachtungen lassen die folgenden Schlüsse zu:

1) Asparagin wird von *P. putida* extrazellulär hydrolysiert. Dabei werden eventuell sowohl Amino- als auch Amidgruppen abgespalten.

2) Da Asparagin zwar aus dem Medium verschwindet, die NH_4^+ -Ionen aber zunächst im Medium akkumulieren, scheint die Verwertung der N-Komponenten von Asparagin eher unbedeutend zu sein. In diesem Fall könnte Asparagin deshalb eine Bedeutung als C-Quelle haben.

Diese Vermutung wurde in einem weiteren Versuch mit *P. fluorescens* überprüft. Die Bakterienzellen wurden hierfür von einer Vorkultur M9-Glc/ NH_4^+ entweder auf M9-Glc/Asn oder M9-Asn umgesetzt (vgl. 4.3.2). In diesem Fall wurde neben den Konzentrationen von NH_4^+ -Ionen und Asparagin auch die Konzentration von Aspartat im Medienüberstand bestimmt. War Asparagin als einzige C- und N-Quelle vorhanden, so wurde es schneller abgebaut als in einem Medium, in dem zusätzlich Glucose

vorhanden war. Gleichzeitig akkumulierte in diesem Fall Aspartat und seine Konzentration nahm erst im späteren Kulturverlauf wieder ab, während die Konzentration von Aspartat bei zusätzlicher Anwesenheit von Glucose über den gesamten Kulturverlauf niedrig blieb. Die Konzentration von NH_4^+ -Ionen stieg in den Medien mit Asparagin als einziger N- und C-Quelle deutlich über die Konzentration an Ammoniumionen des Glucose und Asparagin enthaltenen Mediums an.

Die Messungen zeigen, daß Asparagin von *P. fluorescens* als einzige N- und C-Quelle genutzt werden kann. Die weiteren Beobachtungen können wie folgt interpretiert werden:

1) Der schnellere Abbau von Asparagin in einem Medium, das nur Asparagin als C- und N-Quelle enthält, könnte auf eine verstärkte Induktion des Asparagin abbauenden Enzyms oder auf eine Repression des entsprechenden Enzyms in Anwesenheit von Glucose im Medium zurückzuführen sein.

2) Durch den „schnelleren“ Abbau von Asparagin akkumuliert Aspartat zunächst im Medienüberstand. Ein Grund hierfür könnte z.B. eine „Sättigung“ des entsprechenden Aspartat-Transporters in der Zelle sein. Entsteht Aspartat langsamer, so kann es gleichmäßig in die Zelle transportiert werden und akkumuliert nicht.

3) Die hohen Konzentrationen an Ammoniumionen bei Wachstum auf M9-Asn lassen auf eine weitere Umsetzung von Aspartat, eventuell durch die Aspartase, schließen. Das entstehende Fumarat ist ein Intermediat des Citratcyclus und könnte auf diesem Weg unmittelbar als C-Quelle genutzt werden.

Welche Rolle Aminosäuren für die Nährstoffversorgung von Bodenbakterien spielen, ist bisher unklar und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Daß verschiedene Aminosäuren gute N-Quellen darstellen, wurde bereits beschrieben. Möglicherweise spielen aber Aminosäuren auch als Kohlenstofflieferanten eine Rolle. Interessante Hinweise geben hier zum Beispiel die Untersuchungen an Tn5-B20-Mutanten des Bakteriums *P. fluorescens* mit *lac-Z* als Reportergen [Van Overbeek und van Elsas, 1995]. Verschiedene Mutanten wurden daraufhin untersucht, ob sie nach Zugabe von Wurzelexsudaten des Weizens oder auch einzelner Exsudatskomponenten β -Galactosidase-Aktivität zeigen. Eine Mutante, deren Genexpression ausschließlich durch Prolin induziert wurde, zeigte in Medium, das NH_4Cl und Prolin enthielt, deutlich höhere Reportergenaktivität als bei Wachstum in einem Medium mit Glucose und Prolin. Nur geringe β -Galactosidase-Aktivität konnte auf Glucose/ NH_4Cl -Medium

beobachtet werden [Van Overbeek und van Elsas, 1995]. Dies deuten die Autoren damit, daß die Anwesenheit einer C-Quelle, möglicherweise auf höherer regulatorischer Ebene, z.B. durch Katabolitrepression, die Genexpression vermindert.

Eindrucksvolle Ergebnisse erhielten O'Sullivan *et al.* [1991] bei Besiedlungsexperimenten einer Mutante des Bakteriums *Pseudomonas* sp. M114 von Zuckerpflanzen. Die Mutante konnte Zucker nicht über den Entner-Doudoroff-Weg abbauen, also Glucose, Gluconat, Fructose, Mannitol und Glycerol nicht verwerten und hatte zusätzlich einen Defekt bei der Verwertung von Fumarat, Succinat und Malat. Trotzdem zeigte die Mutante, zumindest bei *in vitro*-Besiedlungsstudien, das gleiche Besiedlungspotential wie der Wildtyp. Dies zeigt, daß eine Vielzahl an C-Komponenten in der Rhizosphäre vorhanden sein muß und der *Pseudomonas*-Stamm M114 in der Lage ist, diese Vielfalt adäquat zu nutzen.

5.3 Identifizierung und Charakterisierung der Asparaginasen aus *P. fluorescens* (WT)

Wie in Kap. 5.1 zu Beginn der Diskussion beschrieben wurde, konnten bei Bakterienwachstum von *P. fluorescens* (WT) auf Asparagin und Glutamin hohe Aktivitäten einer Asparaginase bzw. Glutaminase nachgewiesen werden. Ebenso ging aus vorangegangenen Untersuchungen hervor, daß Asparagin vorwiegend extrazellulär hydrolysiert wird. Dabei scheint dessen Hydrolyse bei zusätzlicher Anwesenheit von Glucose im Medium verlangsamt zu sein (vgl. 4.3.2). Um hierzu genauere Aussagen treffen zu können, wurde die Aktivität einer Asparaginase/Glutaminase im Überstand, Periplasma und Cytosol von *P. fluorescens* (WT) unter verschiedenen Nährstoffbedingungen bestimmt (vgl. 4.4.2).

Die Ergebnisse zeigten, daß die Aktivität des periplasmatischen Enzyms dann am höchsten war, wenn die Bakterien auf Asparagin oder Glutamin als einziger N- und C-Quelle wuchsen. Bei Anwesenheit von Glucose zusätzlich zu Asparagin im Medium, war die gemessene Asparaginaseaktivität deutlich geringer, in M9-NH₄⁺/Glc-Medium war keine Enzymaktivität meßbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß dieses Enzym der Katabolitrepression unterliegt.

Nur eine geringe Aktivität zeigte sich im zellfreien Überstand, wenn die Zellen bereits in der späteren logarithmischen Wachstumsphase waren. Nach dem Umsetzen

der Zellen auf neues Medium war aber zum Teil auch Asparaginase-Aktivität im Zellüberstand nachweisbar. Es ist aber wahrscheinlich, daß die in Zellüberstand und Periplasma gemessenen Aktivitäten auf dasselbe Enzym zurückzuführen sind und der Aktivitätsnachweis in zellfreiem Medium mit einer Sezernierung des periplasmatischen Enzyms erklärt werden kann. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß die gemessenen Aktivitäten gegenüber Induktions- und Repressionseinflüssen völlig gleiches Verhalten zeigten. Daß zellfreie Überstände des Bakteriums *P. fluorescens* eine Asparaginase-Aktivität aufweisen, wurde schon früher beobachtet: De Groot und Lichtenstein [1960] beschrieben die Hydrolyse von L- und D-Asparagin. Eine extrazelluläre L-Glutaminase-Aktivität der Bakterien *P. fluorescens*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio costicola* wurde von Renn und Chandrasekaran [1992] nachgewiesen.

Die Asparaginase-Aktivität im Cytosol war unter allen gegebenen Induktionsbedingungen, also auch auf M9-Glc/NH₄⁺-Medium, vorhanden. Ihre Aktivität scheint von den Nährstoffbedingungen im Medium weniger beeinflußt zu sein als die des periplasmatischen Enzyms.

Die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Aktivitätsuntersuchungen der „Asparaginasen“ wurde mit dem Substratanalogen von Asparagin, AHA durchgeführt (vgl. 3.3.2). Gründe hierfür sind die schnelle Durchführbarkeit, die hohe Empfindlichkeit sowie eine hohe Spezifität des entsprechenden Nachweises. Allerdings erlaubt dieser Test keine direkten Rückschlüsse auf das Katalyseverhalten der Asparaginasen gegenüber ihren eigentlichen Substraten, also L-Asn oder L-Gln.

Solche Informationen liefert der „gekoppelte Enzymtest“ (vgl. 3.3.1). Da dieser Test aber auf dem Nachweis freigesetzter NH₄⁺-Ionen beruht, ist er zur direkten Bestimmung von Enzymaktivitäten im Medium aufgrund der Anwesenheit störender Konzentrationen von NH₃ ungenau.

Aus diesem Grund und um weitere Informationen über die Eigenschaften der „Asparaginasen“ der jeweiligen Zellkompartimente (Periplasma, Cytosol) zu gewinnen, wurden diese aufgereinigt. Die Reinigung wurde nach Zellfraktionierung der Bakterien durch osmotischen Schock (periplasmatische Proteine) und anschließenden Ultraschallaufschluß (cytosolische und periplasmatische Enzyme) durchgeführt. Aus dem periplasmatischen Aufschluß konnte eine Amidohydrolase bis zur Homogenität gereinigt werden. Sie setzt neben L-Asparagin auch D-Asparagin und L-Glutamin in einem Verhältnis von 1:0,4:1,4 um. Das Enzym wurde mit PfGA für *P. fluorescens*-Gluta-

minase-Asparaginase bezeichnet. Durch N-terminale Sequenzierung wurden die ersten 10 Aminosäuren des Enzyms bestimmt. Diese zeigten eine 100%ige Homologie zu den ersten 10 Aminosäuren einer aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des für die PfGA kodierenden *ansB*-Gens, das von Hüser [1999] kloniert und sequenziert wurde. Das gereinigte Enzym hat einen isoelektrischen Punkt von 8,6 und eine Masse von 38 kDa.

Aus der cytosolischen Proteinfraction wurde ein zweites Enzym angereichert, das ausschließlich L-Asn umsetzt. Dieses Enzym wurde entsprechend mit PfA (*P. fluorescens*-Asparaginase) bezeichnet. Die PfA war durch 0,6 mM pCMB bis zu 90 % hemmbar. Das aus dem Periplasma gereinigte Enzym hat mit einem K_m -Wert von 210 μ M eine ca. zehnfach höhere Substrataffinität für das Substratanalogon AHA als die PfA ($K_m=1,7$ mM). Diese Tatsache läßt allerdings noch keine Rückschlüsse darüber zu, ob dieses Verhältnis tendenziell dem einer Umsetzung von L-Asparagin entspricht.

In der Literatur wurden bereits verschiedene Asparaginasen/Glutaminasen in *Pseudomonas* beschrieben. Aus dem Bakterium *P. fluorescens* AG konnten zwei Asparaginasen isoliert werden [Nikolaev *et al.*, 1975; Kovalenko *et al.*, 1977]. Eines der beiden Enzyme katalysiert sowohl die Hydrolyse von L-Asparagin, D-Asparagin und L-Glutamin (in einem Verhältnis von 1:0,7:1) und hat einen K_m -Wert für L-Asparagin von 450 μ M [Kovalenko *et al.*, 1977]. Es ist offenbar ein Tetramer, das sich aus Untereinheiten einer Masse von etwa 30 kDa zusammensetzt [Rakov *et al.*, 1977]. Das zweite Enzym setzt ausschließlich L-Asparagin um, hat eine Masse von 70 kDa und der K_m -Wert beträgt 410 μ M [Nikolaev *et al.*, 1975]. Auch in den Bakterienstämmen *Pseudomonas* 7A sowie *P. acidovorans* wurde eine Glutaminase-Asparaginase nachgewiesen werden [Roberts, 1976; Davidson, 1977]. Beide Enzyme besitzen hohe Substrataffinitäten für L-Gln und L-Asn (*Pseudomonas* 7A: $K_m= 4,6$ μ M für L-Gln, $K_m= 4,4$ μ M für L-Asn, *P. acidovorans*: 22 μ M für L-Gln, 15 μ M für L-Asn). Die Masse wurde für das Enzym aus *Pseudomonas* 7A mit 36 kDa, für das Enzym aus *P. acidovorans* mit 39 kDa angegeben. Interessant ist, daß die PGA aus *Pseudomonas* 7A erst dann in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, wenn Glutaminsäure im Medium vorhanden war, Glucose hingegen inhibierte die Herstellung des Enzyms [Roberts, 1976]. Dies würde den in dieser Arbeit beschriebenen Verhältnissen entsprechen.

5.4 Der Einfluß von C-Quellen auf die PfGA und PfA

Die PfGA wird durch ihre Substrate Asparagin und Glutamin stark induziert, wenn diese als einzige N- und C-Quellen vorliegen. Die gleichzeitige Anwesenheit von alternativen C-Quellen wie Glucose, Succinat, Pyruvat, Fumarat und α -Ketoglutarat hemmt hingegen ihre Aktivität (vgl. 4.4.3 und 4.4.3.1). Das Enzym scheint damit der Katabolitrepession durch verschiedene C-Quellen zu unterliegen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß die Substrate der PfGA, Asn und Gln, eine Bedeutung als Kohlenstoffquellen für *P. fluorescens* haben. Für das Bakterium *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, daß bei einem kombinierten Angebot von Zuckern (Glucose, Fructose, Mannitol) und organischen Säuren (wie z. B. Citrat, Succinat, Fumarat) die organischen Säuren bevorzugt als Kohlenstoffquelle genutzt werden [Wolff *et al.*, 1991]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten allerdings, daß bezüglich der Hemmwirkung auf die PfGA keine extremen Unterschiede zwischen den erwähnten Kohlenstoffkomponenten bestanden.

Interessant, aber bisher nicht zu erklären, ist die Tatsache, daß die PfGA nicht nur durch ihre Substrate L-Glutamin und L-Asparagin sondern auch durch ihre Katalyseprodukte L-Glutamat und L-Aspartat stark induziert wird. Diese Ergebnisse wurden durch Induktionsexperimente (vgl. 4.4.4) gefunden und konnten auch mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese verifiziert werden (4.5.2). Eine Erklärung für diese Tatsache könnte darin liegen, daß das Gen für die PfGA und die Aspartase in einem gemeinsamen Operon liegen. Dies ist z.B. bei *Bacillus subtilis* gegeben. Das *ans*-Operon kodiert dort für beide Enzyme, die gleichermaßen durch Asparagin und Aspartat induziert werden können [Sun und Setlow, 1993].

Allerdings zeigte sich sogar, daß die Induktion der PfGA durch die Substrate Asparagin und Glutamin gegenüber ihren Umsetzungsprodukten Aspartat und Glutamat mit einer gewissen Zeitverzögerung stattfindet. Offenbar sind Aspartat und Glutamat die eigentlichen Induktoren der PfGA und vermitteln möglicherweise die Induktion von Enzymen auf einer höheren regulatorischen Ebene. Es wäre denkbar, daß ein ganzes Regulon induziert wird, das die Aufnahme, den Abbau und die Verwertung von Aspartat, Glutamat, Asparagin und Glutamin steuert. Ein solches Sensorsystem, das zugleich eine Verwertung von Glutamat und Aspartat als auch ihrer entsprechenden Säureamide Asparagin und Glutamin vermittelt, könnte deshalb sinnvoll sein, weil in den Wurzelexsudaten meist sowohl Aspartat und Glutamat als auch Asparagin und

Glutamin vorhanden sind. Unter solchen Voraussetzungen wäre eine spezifischere Induktion der verwertenden Enzyme unnötig.

Die cytosolische PfA schien von der Nährstoffzusammensetzung des Mediums weniger beeinflusst zu sein, zumindest waren die beobachteten Effekte hier weniger ausgeprägt. Es ist denkbar, daß die PfA eine anabolische Funktion hat, während die PfGA verfügbare Nährstoffe abbaut.

5.5 Untersuchung der periplasmatische Asparaginase in Biokontrollstämmen

Verschiedene Pseudomonaden, die als Biokontrollstämmen bekannt sind, zeigten besonders hohe Aktivitäten einer periplasmatischen Asparaginase. Diese erreichte im Vergleich zur PfGA bis zu siebenfach höhere Werte bei Wachstum der Bakterien auf M9-Asn (vgl. 4.4.2.1). Niedrige Aktivitäten zeigten hingegen die entsprechenden Enzyme der pflanzenpathogenen Stämme *P. syringae* pv. *glycinea* und *P. syringae* pv. *tomato*. Allerdings muß für die beiden zuletzt genannten Bakterienstämme berücksichtigt werden, daß diese zwar Bodenbesiedler sind, die eigentliche Pflanzenschädigung durch diese Bakterien aber am Blatt hervorgerufen wird [Dunleavy, 1988].

Untersuchungen über die Induktion bzw. Repression des entsprechenden Enzyms durch C-Quellen, ergaben ähnliche Tendenzen wie bei der PfGA (vgl. 4.4.3.1). Höchste Aktivitäten zeigte die PsGA der Biokontrollstämmen auf Aspartat und Asparagin, wobei die erstgenannte Aminosäure meist die stärkste Induktion hervorrief. Ebenfalls hohe Aktivitäten wurden bei Wachstum auf M9-Asn/Saccharose gemessen. Saccharose wurde als C-Quelle eingesetzt, da sie in der Pflanze als wichtige Transportform zur Versorgung der verschiedenen Pflanzenteile wie z.B. der Wurzel dient [Heldt, 1999]. Bei Abgabe dieses Zuckers über die Wurzel könnte sie damit eine gute Kohlenstoffquelle für die Bakterien darstellen. Saccharose reprimierte die PsGA der verschiedenen Bakterienstämme allerdings kaum. Eine Repression der PsGA erfolgte dann, wenn neben Asparagin die Kohlenstoffquellen Glucose, Pyruvat, Fumarat oder α -Ketoglutarat im Medium vorhanden waren. Nur basale Aktivitäten der periplasmatischen Asparaginase waren in M9-Glc/ NH_4^+ meßbar. Ein etwas anderes Verhalten der PsGA-Aktivitäten zeigte interessanterweise der Biokontrollstamm *P. fluorescens* Pf-5. Die Repression der PsGA war hier in Anwesenheit von Glucose deutlich vermindert und

auch Fumarat, α -Ketoglutarat und Pyruvat wirkten weniger stark reprimierend auf das Enzym als in anderen untersuchten Bakterienstämmen. Das Bakterium Pf-5 ist ein gut untersuchter Biokontrollstamm. Es unterdrückt verschiedene Pflanzenschädlinge wie z.B. *Pythium ultimum* und produziert die Antibiotika Pyrrolnitrin, Pyoluteorin und 2,4-Diacetylphloroglucinol [Kraus *et al.*, 1992]. Die Frage, ob das Bakterium *P. fluorescens* Pf-5 durch diese offensichtlich andere Regulation der PsGA eventuell ein höheres Besiedlungspotential der Wurzel besitzt, ist offen und bleibt zu klären.

5.6 Die Verwertung von Aspartat durch *P. fluorescens* (WT)

Die Aktivität der Aspartase wurde in *P. fluorescens* zwar nachgewiesen, wurde allerdings durch Aminosäuren weder induziert noch reprimiert, wie dies bei der PfGA beobachtet wurde. Daß in diesem Fall Asparagin und Glutamin statt Aspartat und Glutamat für die Aktivitätsuntersuchungen eingesetzt wurden, scheint hier gerechtfertigt, da zuvor gezeigt worden war, daß Asparagin bzw. Glutamin im Medium schnell zu Aspartat und Glutamat abgebaut werden und diese auch im Medienüberstand nachweisbar waren. Untersuchungen zur Aktivität der Aspartase in *P. fluorescens* wurde schon von Miyamoto und Katsuki [1992] durchgeführt. Sie untersuchten die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung, darunter: NH_4^+ /Glucose, NH_4^+ /Succinat, NH_4^+ /Fumarat, Glutamat, Aspartat und Casaminosäuren. Es zeigte sich, daß die Aktivität in den jeweiligen Medien nahezu identisch war (etwa 1,3 U/mg). Geringfügig höhere Aktivitäten (ca. + 0,2 U/mg) waren auf den Aminosäuren und Casaminosäuren meßbar. Aus diesem Grund diskutierten die Autoren die Möglichkeit, daß die Aspartase in *P. fluorescens* sowohl bei der Aminierung als auch bei der Desaminierung eine Rolle spielen könnte. Dies wäre allerdings außergewöhnlich, da in anderen Bakterien die Funktion des Enzyms ausschließlich bei der Desaminierung von Aspartat zu liegen scheint [Miyamoto und Katsuki, 1992].

Die Konzentrationsabnahme von Aspartat und Glutamat im Verlaufe der Kulturdauer könnte auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen könnten die Aminosäuren durch die Aspartase oder ein anderes Enzym im Periplasma unter Freisetzung von NH_3 abgebaut werden. Eine Induktion der Aspartase konnte in dieser Arbeit zwar nicht nachgewiesen werden, dies schließt allerdings eine Umsetzrate, die

zur weiteren Nährstoffversorgung des Bakteriums effektiv genug ist, nicht unbedingt aus.

Die zweite Erklärung liegt in einem Transport des im Periplasma vorliegenden Aspartats bzw. Glutamats in das Zellinnere. Nach der Umsetzung von Aspartat könnte überschüssiges NH_3 die Zelle verlassen und wäre damit im Medienüberstand nachweisbar.

Die meisten Transportprozesse sind spezifisch für eine oder zumindest eine geringe Anzahl strukturell verwandter Aminosäuren [Walshaw und Poole, 1996]. Der Transport von Glutamin durch *E. coli* wird z.B. durch ein Bindeprotein vermittelt, welches ausschließlich für Glutamin spezifisch ist [Masters und Hong, 1981]. Hingegen wurde in *Rhizobium leguminosarum* ein ABC-Transporter (Aap) mit einer weiten Spezifität für Aminosäuren gefunden [Walshaw und Poole, 1996]. Er hat eine hohe Affinität zu Glutamat, dessen Aufnahme aber durch Aspartat und Alanin inhibiert werden kann. Die Autoren vermuten deshalb eine Hierarchie in Bezug auf die Affinität der zu transportierenden Substanzen. Gene mit großen Ähnlichkeiten zu Aap von *R. leguminosarum* wurden auch in *P. fluorescens* und *E. coli* gefunden [Walshaw und Poole, 1996].

Vor diesem Hintergrund wurde Versuch 4.4.5 durchgeführt, um Hinweise auf eine mögliche Induzierbarkeit oder Hierarchie des Transportes von Aspartat oder Glutamat zu gewinnen. Die Werte lassen allerdings erkennen, daß die Konzentrationen von Aspartat und Glutamat im Medienüberstand mit etwa gleicher Geschwindigkeit abnehmen. Diese Ergebnisse deuten eher auf zwei voneinander unabhängige Transportsysteme hin oder aber ein System, das beide Aminosäuren gleich schnell transportiert. Auffällig war eine zeitverzögerte Abnahme der Konzentrationen von Asp und Glu, wenn die Bakterienzellen zuvor auf M9-Glc/NH_4^+ inkubiert worden waren. Diese Tatsache könnte entweder mit einer Induzierbarkeit des Transportsystems erklärt werden oder aber mit der zeitverzögerten Induktion eines Enzyms, das Aspartat oder Glutamat abbaut.

5.7 Differentiell exprimierte Proteine in *P. fluorescens* und *P. putida* KT2440

Neben der PfGA wurden bei Wachstum des Bakteriums *P. fluorescens* auf M9-Asn 13 weitere Proteine gefunden, die unter diesen Bedingungen, nicht aber in M9-Glc/NH₄⁺ induziert wurden. Diese Proteine sollten also in direktem Zusammenhang mit dem Abbau von Asparagin stehen. Interessanterweise wurden bei Wachstum des Bakteriums auf M9-Glc/NH₄⁺-Medium 11 Proteine zum Teil stark induziert, die in M9-Asn nicht oder nur schwach zu erkennen sind. Dies könnte damit erklärt werden, daß für den Abbau von Glucose eine völlig andere Enzymgruppe, wie z.B. Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges aktiviert werden. Ein 2D-Gel von Gesamtzellproteinextrakt des Bakteriums *P. fluorescens* bei Wachstum auf M9-Asp wurde hier nur im Ausschnitt gezeigt. Das Proteinmuster entspricht aber weitgehend demjenigen der Zellen nach Wachstum auf M9-Asn. Der in diesen 2D-Gelen mit der Nummer 2 bezeichnete Proteinspot zeigt, daß dieses Enzym unter gleichen Bedingungen wie die PfGA induziert wird (vgl. Abb. 18). Es ist davon auszugehen, daß das entsprechende Protein bei der Verwertung von Asparagin, Aspartat oder deren Metaboliten entscheidend beteiligt ist. Das „Protein 2“ wurde N-terminal ansequenziert (vgl. Abb. 19). Im Sequenzvergleich ergab sich die höchste Übereinstimmung mit einem Protein aus *Rhodospirillum rubrum*, von dem aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu GlnH, BztA und YbeJ angenommen wird, daß es sich um ein Glutamin-Bindeprotein handelt [Zhang *et al.*, 1997]. Weitere signifikante Homologien zeigten sich zu einem Glutamin-Bindeprotein aus *Bacillus stearothermophilus*. Dieses untersteht dem *glnQH*-Operon, das für Proteine kodiert, die in dem Bakterium am aktiven Glutamin-Transport beteiligt sind [Wu und Welker, 1991].

Wie Hüser [1999] anhand der DNA-Sequenz des für die PfGA kodierenden *ansB*-Gens zeigen konnte, untersteht die PfGA der Kontrolle eines σ^{54} -abhängigen Promotors. Da von dem *P. fluorescens*-Wildtypstamm keine σ^{54} -defiziente Mutante vorlag, sollte das Bakterium mit einer *rpoN*-Mutante des Bakteriums *P. putida* KT2440 verglichen werden. Um zu prüfen, a) ob ein der PfGA entsprechendes Enzym in der σ^{54} -defizienten Mutante von *P. putida* KT2440 nicht mehr nachweisbar ist und b) wieviele weitere Proteine in dem *P. putida*-Wildtypstamm, nicht aber in der Mutante induziert werden und somit ebenfalls einem σ^{54} -abhängigen Promotor unterstehen.

Es wurde zunächst untersucht, ob Gesamtzellproteinextrakte des Bakteriums nach Wachstum auf M9-Glu bzw. M9-Glc/NH₄⁺ ein ähnliches Muster ergeben wie das von *P. fluorescens* (WT), um zu gewährleisten, daß Induktions- und Repressionsverhalten beider Bakterien ähnlich war. Diese Vermutung ließ sich bestätigen. Die Anzahl der Proteinspots nach Wachstum auf den Medien M9-Glu und M9-Glc/NH₄⁺ waren mit denen von *P. fluorescens* (WT) vergleichbar. Die 2D-Gele erhärteten die Vermutung des σ^{54} -abhängigen Promotors, da der entsprechende Proteinspot im Gel der Mutante nicht vorhanden war. Dies bestätigten auch vorangegangene Aktivitätsuntersuchungen, in denen die PfGA und eine PsGA von *P. putida* KT2440 (WT) verglichen worden waren [Hüser, 1999].

Desweiteren konnte mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden, daß insgesamt 15 weitere Proteine in dem Wildtypstamm des Bakteriums *P. putida* KT2440, nicht aber in der σ^{54} -defizienten Mutante gebildet wurden. Beim Vergleich der Proteinmuster von *P. putida* KT2440 (WT) auf M9-Glu mit a) Wachstum von *P. putida* KT2440 (WT) auf M9-Glc/NH₄⁺ und b) Wachstum von *P. putida* KT2440 *rpoN*⁻ auf M9-Glu fällt auf, daß ein Großteil identischer Proteine unter beiden Wachstumsbedingungen nicht synthetisiert wird. Dies deutet darauf hin, daß der σ^{54} -Faktor die Expression von Genen reguliert, deren Produkte beim Abbau von Asn, Gln, Asp und Glu relevant sind. Anhand der σ^{54} -Mutante von *P. putida* KT2440 konnten bereits verschiedene Gene identifiziert werden, die in diesem Bakterium ebenfalls σ^{54} -abhängig exprimiert werden [Koehler *et al.*, 1989]. Darunter waren Gene, die für Enzyme für den Abbau von Nitrat, aber auch Aminosäuren wie Ala, Gly, Ser, Leu und Ile und auch Carbonsäuren wie Succinat, Fumarat und α -Ketoglutarat kodieren [Koehler *et al.*, 1989].

Insgesamt ist σ^{54} in Bakterien an der Expression einer Vielzahl von Genen beteiligt, die verschiedenste Funktionen vermitteln, darunter den Transport von Dicarbonsäuren, Pilusproduktion und Stickstoff-Fixierung [Merrick, 1993]. Die typische -24/-12-Konsensussequenz wurde unter anderem vor dem Transkriptionsstartpunkt des *xyl-CAB*-Operons von *P. putida* nachgewiesen [Thöny und Hennecke, 1989]. Die *xyl*-Gene aus *P. putida* kodieren Proteine, die für den Abbau von Toluol, Xylenen und verwandten Kohlenwasserstoffen verantwortlich sind [Vorseley *et al.*, 1978].

5.8 Analyse von Aminosäuren in Wurzelexsudaten

Es ist bekannt, daß Pflanzen eine Vielzahl von Substanzen über die Wurzel abgeben. Darunter sind Zucker wie Glucose, Fructose, Xylose und Oligosaccharide. Auch organische Säuren wie Fumarat, Succinat und Citrat aber auch komplexere Verbindungen wie Nucleotide, Vitamine und Enzyme konnten nachgewiesen werden [Lynch und Whipps, 1990]. In dieser Arbeit wurde mittels HPLC analysiert, welche Aminosäuren Weizen, Gerste und Reis über die Pflanzenwurzel abgeben.

Als Nährmedium wurde Hoagland-Medium verwendet, das allerdings zunächst bei der Aminosäureanalyse zu Problemen führte: Durch die Anwesenheit zweiwertiger Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} waren die Aminosäuren Aspartat und Glutamat aufgrund von Komplexbildung nicht mehr quantitativ nachweisbar. Gerade diese Aminosäuren wurden aber neben Asparagin und Glutamin aber als die häufigsten in der Rhizosphäre beschrieben und waren deshalb bei diesen Analysen von Interesse. Zudem traten Probleme mit Verunreinigungen aus Komponenten des Hoaglandmediums auf, die zum Teil die Zuordnung von Aminosäurepeaks in den Chromatogrammen erschwerten. Deshalb wurden die Exsudatproben zusätzlich über das Säulenmaterial AG50WX-8 gereinigt. Diese Methode ist bereits von Simons *et al.* [1997] beschrieben worden und ergab die gewünschten Resultate. Ein anderes Problem trat durch die Überlagerung der Aminosäurepeaks von Asparagin und Serin bzw. Glutamin und Glycin auf, durch die eine Konzentrationsbestimmung der einzelnen vier Aminosäuren nicht mehr möglich war. Durch die Veränderung des Gradienten konnte die Trennung der Aminosäuren im vorderen Bereich des Chromatogramms aber deutlich verbessert werden. Die Aminosäureanalyse zeigte, daß Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat, aber auch Valin Isoleucin und Leucin und bei Weizenpflanzen auch Alanin zu den häufigsten in den Exsudatproben vorkommenden Aminosäuren zählten.

Die Umrechnung der Stoffmenge an Aminosäuren pro Pflanze auf das Rhizosphärenvolumen gibt zwar einen Anhaltspunkt und veranschaulicht die Vorstellung von den möglichen Konzentrationen, ist aber nur als grobe Schätzung zu betrachten. Es ist anzunehmen, daß sich die Wurzelexsudate über den unmittelbaren Wurzelbereich hinaus über das gesamte Volumen der wäßrigen Lösung verteilen. Dies könnte für zukünftige Besiedlungsstudien mit Bakterien ein Problem darstellen. Die Rhizosphäre mit ihren hohen Nährstoffkonzentrationen ist im Boden auf einen sehr kleinen Raum um die Wurzel beschränkt. Dagegen begünstigt die wäßrige Umgebung die Diffusion

der Nährstoffe über weitere Strecken. Daraus folgt eine im Vergleich zur Situation im Boden geringere Nährstoffkonzentration, was die Besiedlung ungünstig beeinflussen könnte. Ein Ziel dieser Arbeit lag darin, Hinweise darauf zu erhalten, ob Bodenbakterien durch die effiziente Nutzung insbesondere durch die Aminosäuren Asparagin, Glutamin sowie Aspartat und Glutamat einen Selektionsvorteil haben könnten. Ergebnisse, die im Grunde gegen diese Hypothese sprechen, wurden von Simons *et al.* [1997] gezeigt. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, daß Mutanten des *Pseudomonas*-Stammes *P. fluorescens* WCS365, die selbst keine Aminosäuren synthetisieren konnten, die Wurzel erst nach Zugabe der entsprechenden Aminosäuren besiedeln konnten. Allerdings betraf diese verminderte Besiedlungsfähigkeit nur die Wurzelspitze der Pflanze. Die Bakteriendichte oberer Wurzelschichten entsprach etwa der des Wildtyps [Simons *et al.*, 1997], was zeigte, daß auch eine Vermehrung der Mutante stattgefunden haben muß. Eine mögliche Erklärung für das verminderte Besiedlungspotential der Mutante könnte in einer verminderten Fähigkeit zur Proteinsynthese und dem Verlust von Eigenschaften wie Mobilität oder ähnlichem sein. Dies könnte schon grundsätzlich die Fähigkeit verhindern, zu Orten hoher Nährstoffkonzentration zu gelangen.

5.9 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollen anhand von Abb. 25 noch einmal zusammenfassend erläutert werden:

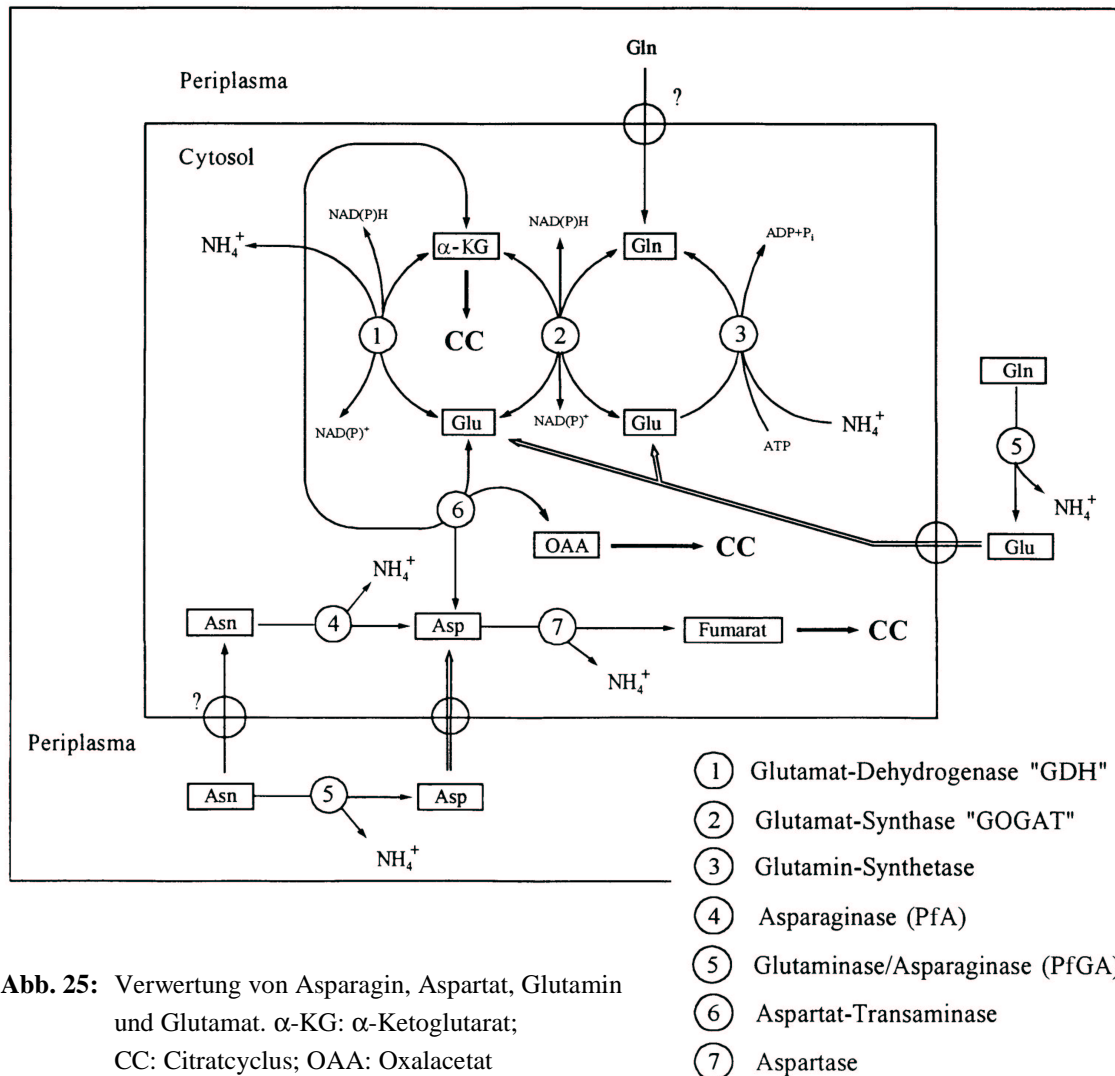


Abb. 25: Verwertung von Asparagin, Aspartat, Glutamin und Glutamat. α-KG: α-Ketoglutarat; CC: Citratcyclus; OAA: Oxalacetat

Die Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat können von Pseudomonaden sowohl als N- wie auch als alleinige C-Quelle verwertet werden. In *P. fluorescens* (WT) konnten die drei Schlüsselenzyme des N-Stoffwechsels: 1) Glutamat-Dehydrogenase, 2) Glutamat-Synthase und 3) Glutamin-Synthetase nachgewiesen werden. GDH und GOGAT zeigten bei Bakterienwachstum auf den oben genannten Aminosäuren mit ca. 0,05 U/mg eine geringere Aktivität als die GS mit ca. 0,2 U/mg. Mittels NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, daß bei Inkubation der Bakterien auf ¹⁵NH₄Cl und ¹⁵N-Glutamat das markierte Stickstoffatom in Glutamin und Glutamat nachzuweisen ist. Diese beiden Substanzen scheinen wie auch in vielen anderen Bakterien als N-Donatoren für weitere N-haltige Verbindungen genutzt zu werden. Bei Wachstum von

P. fluorescens (WT) auf Asparagin oder Glutamin als einziger N- und C-Quelle wurden beide Substanzen unter Freisetzung von NH_3 von der periplasmatischen PfGA hydrolysiert, und Aspartat ist zunächst im Medienüberstand nachweisbar. Ob auch Asparagin in die Zelle transportiert werden kann, ist noch nicht geklärt. Aspartat wird im Cytosol durch eine Aspartase weiter zu Fumarat abgebaut. Dieses ist ein Intermediat des Citratcyclus und könnte so direkt als C-Quelle zur Verfügung stehen.

In *P. fluorescens* konnten zwei Asparaginasen nachgewiesen werden. Das eine Enzym setzt ausschließlich L-Asparagin um (PfA), das zweite Enzym hydrolysiert L-Asparagin, D-Asparagin und L-Glutamin (PfGA). Die PfGA wird von L-Asparagin und L-Glutamin, aber auch von ihren Abbauprodukten L-Aspartat und L-Glutamat induziert und von anderen C-Quellen wie Glucose und Fumarat reprimiert. Für die PfA scheinen diese Effekte weniger ausgeprägt. Allerdings sind die Ergebnisse für Induktion und Repression für dieses Enzym zum Teil noch nicht eindeutig.

In verschiedenen Biokontrollstämmen konnten hohe Aktivitäten einer PsGA nachgewiesen werden (bis zu siebenfache Werte im Vergleich zur PfGA). Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle dieses Enzyms bei der Aminosäureverwertung in Wurzelexsudaten hin.

Inwiefern Aminosäuren in Wurzelexsudaten, insbesondere die in dieser Arbeit untersuchten, für die Nährstoffversorgung der Bodenbakterien eine Rolle spielen, ist bisher offen. Um hierüber Erkenntnisse zu gewinnen wäre es notwendig Mutanten herzustellen, denen die Fähigkeit fehlt diese Aminosäuren zu verwerten. Um Wildtyp und Mutante im Boden zu unterscheiden, könnten diese Mutanten z.B. mit Markergenen wie *lacZ* oder *gfp* gekennzeichnet werden. Anhand von Besiedlungsstudien der Wurzel würde dies Informationen darüber liefern, ob die Mutanten in ihrer Rhizosphärenkompetenz beeinträchtigt sind.

Eine weitere wichtige Frage wäre, ob tatsächlich ein Regulon existiert, das die Induktion einer ganzen Gruppe von Enzymen vermittelt, die an Transport, Abbau und Verwertung von Aminosäuren beteiligt sind und ob dieses Regulon mit der σ^{54} -abhängigen Expression von Genen in Zusammenhang steht. Durch die Identifizierung eines solchen Regulons könnten wichtige Fragen zur Katabolitrepression und der Verwertung von Aminosäuren durch Pseudomonaden beantwortet werden.

Interessant wären auch Untersuchungen dazu, ob die Wurzelexsudation durch die Besiedlung mit Bakterien in Menge und Zusammensetzung beeinflussbar und im Verhältnis zu sterilen Pflanzen wesentlich verändert ist. Dies könnte unter anderem Hinweise darauf geben, ob Pflanzen in der Lage sind gezielt Bedingungen in der Rhizosphäre zu schaffen, die eine Ansiedlung von nützlichen Mikroorganismen fördern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen geben einen beträchtlichen Anteil ihrer Photosyntheseprodukte über die Wurzel in den Boden ab. Bodenmikroorganismen können diese Exsudate als Nährstoffe nutzen und durch deren besonders effiziente Verwertung ihre Rhizosphärenkompetenz sichern. Die Bakterien *P. fluorescens* und *P. putida* gehören zu typischen Besiedlern von Nutzpflanzen und sind Biokontrollorganismen, die das Pflanzenwachstum positiv beeinflussen. Diese beiden *Pseudomonas*-Arten wurden im Hinblick darauf untersucht, wie sie Aminosäuren, insbesondere die in Wurzelexsudaten häufig anzutreffenden Aminosäuren Glutamat und Aspartat sowie deren entsprechenden Säureamide verwerten können. Es wurde gezeigt, daß diese Aminosäuren gut als N-Quellen genutzt werden können. Dabei wurde mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie nachgewiesen, daß Glutamin und Glutamat Intermediate des N-Stoffwechsels sind, die als Ausgangsverbindungen für andere stickstoffhaltige Verbindungen dienen. Die Schlüsselenzyme des N-Stoffwechsels, die Glutamat-Dehydrogenase, die Glutamin-Synthetase und die Glutamat-Synthase sind in den genannten Bakterien an der N-Assimilation beteiligt.

Die genannten Aminosäuren können aber auch als C-Quelle genutzt werden. In dem Bakterium *P. fluorescens* wurden zwei verschiedene Asparagin abbauende Enzyme nachgewiesen. Das erste Enzym ist im Periplasma lokalisiert und wurde aufgrund seiner Eigenschaft neben L-Asparagin auch D-Asparagin und L-Glutamin umzusetzen mit PfGA (für *P. fluorescens*-Glutaminase-Asparaginase) bezeichnet. Es hat einen IEP von 8,6 und eine Masse von etwa 38 kDa. Die PfGA wird durch Asparagin und Glutamin, aber auch durch die Produkte Aspartat und Glutamat induziert und durch zusätzliche C-Quellen im Medium wie Glucose, Fumarat und α -Ketoglutarat reprimiert. Ein zweites Enzym wurde im Cytosol nachgewiesen. Es setzt fast ausschließlich L-Asparagin um und ist durch 0,6 mM pCMB hemmbar. Verschiedene Biokontrollstämme wie *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* W24, *P. fluorescens* W34 und *P. putida* W232 zeigen hohe Asparaginaseaktivitäten eines periplasmatischen Enzyms. Es wurde eine Methode etabliert, mit der Wurzelexsudate von Pflanzen steril entnommen und mittels HPLC analysiert werden konnten. Durch geeignete Aufarbeitung der Exsudate und Optimierung des HPLC-Gradienten wurden Analyse und Auftrennung des Aminosäuregemisches verbessert. Die Analyse der Wurzelexsudate von Weizen, Gerste und Reis ergab einen hohen Anteil der Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Aspartat und Glutamat.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	<i>Agrobacterium</i>
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	L-Asparaginsäure- β -hydroxamat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
D ₂ O	Deuteriumoxid
dd H ₂ O	bidestilliertes Wasser
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOGAT	Glutamat-Synthase
GS	Glutamin-Synthetase
GSPB	Göttinger Sammlung phytopathogener Bakterien
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MOPS	3-[N-Morpholino]propanulfonsäure
NAD(P) ⁺	oxidierte Form von Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat)
NAD(P)H	reduzierte Form von Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat)

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD _{600nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p.a.	pro analysi
pCMB	<i>para</i> -Chloromercuribenzoat
PfA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -Asparaginase
PfGA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -Glutaminase-Asparaginase
PGA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 7A-Glutaminase-Asparaginase
PITC	Phenylisothiocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PsGA	<i>Pseudomonas</i> -Glutaminase-Asparaginase
pv.	pathovar
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>R.</i>	<i>Rhodospirillum</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
v _{max}	maximale Geschwindigkeit
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Weitere Abkürzungen, insbesondere die Drei-Buchstaben-Codes der Aminosäuren wurden entsprechend der „Information for Authors“ (1997) des European Journal of Biochemistry verwendet.

8 LITERATUR

Barber, D.E.; Martin, J.K.

The release of organic substances by cereal roots in soil. *New Phytologist* **1976**, 76: 69-80

Bellion, E.; Tan, F.

NADP-dependent glutamate dehydrogenase from a facultative methylotroph, *Pseudomonas* sp. strain AM1. *J. Bacteriol.* **1984**, 157 (2):435-439

Bender, C.L.; Liyanage, H.; Palmer, D.; Ullrich, M.; Young, S.; Mitchell, R.

Characterisation of the genes controlling the biosynthesis of the polyketide phytotoxin coronatine including conjugation between coronafacic and coronamic acid. *Gene* **1993**, 133(1): 31-38

Berger, S.; Braun, S.; Kalinowski, H.O.

NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen, Band 2: ^{15}N -NMR-Spektroskopie, VCH, Weinheim, 1. Aufl. **1992**

Braun, S.; Kalinowski, H.O.; Berger, S.

100 and more basic NMR Experiments, VCH, Weinheim, 2. Aufl. **1996**, 360ff

Bergmeyer, H.U.

Methoden der enzymatischen Analyse, VCH, Weinheim, 1. Aufl. **1974**

Bloemberg, G.V.; O'Toole, G.A.; Lugtenberg, B.J.J.; Kolter, R.

Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63: 4543-4551

Bradford, M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72: 248-254

Brown, P.R.; Tata, R.

Growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutants lacking glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* **1981**, 147 (1):193-197

Buell, C.R.; Anderson, A.J.

Expression of the *aggA* locus of *Pseudomonas putida* *in vivo* and *in planta* as detected by the reporter gene, *xylE*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1993**, 6: 331-340

Campbell, R.; Greaves, M.P.

Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: *The Rhizosphere* (Lynch, J. M., ed.) **1990**, 11-35. John Wiley & Sons, Chichester, UK

Cangelosi, G.A.; Ankenbauer R.G.; Nester E.W.

Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmatic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990a**, 87: 6708-6712

Carty, S.M.; Sreekumar, K.R.; Raetz, C.R.

Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *E. coli*. Induction at 12 °C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (14): 9677-9685

Chin-A-Woeng, T.F.C.; de Priester, W.; van der Bij, A.J.; Lugtenberg, B.J.J.

Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* bicontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, 10: 79-86

Collier, D.N.; Hager, P.W.; Phibbs, P.V. Jr.

Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res. Microbiol.* **1996**, 147 (6-7): 551-561

Corpet, F.

Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acid Res.* **1988**, 16 (22): 10881-10890

Davidson, L.; Brear, D.R.; Wingard, P.; Hawkins, J., Kitto, G.B.

Purification and properties of L-glutaminase-L-asparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol.* **1977**, 129 (3):1379-1386

De Groot, N.; Lichtenstein, N.

The action of *Pseudomonas fluorescens* extracts on asparagine and asparagine derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, 40: 99-110

De Leij, F.A.A.M.; Sutton, E.J.; Whipps, J.M.; Fenlon, J.S.; Lynch, J.M.

Fields release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on wheat: establishment, survival and dissemination. *Bio/Technology* **1995a**, 13: 1488-1492

De Weger, L.A.; van der Vlugt, C.I.M.; Wijfjes, A.H.M.; Bakker, P.A.H.M.; Schippers, B.; Lugtenberg, B.J.J.

Flagella of plant growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strains are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* **1987**, 169: 2769-2773

De Weger, A.; Bakker, P.A.H.M.; Shippers, B.; van Loosdrecht, C.M.; Lugtenberg, B.J.J.

Pseudomonas spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharides are affected in their ability to colonize potato roots. NATO ASI Series vol. H36. (Lugtenberg, B.J.J., Ed.):197-202, Springer Verlag, Berlin, **1989**

De Weger, L.A.; van der Bij, A.J.; Dekkers, L.C.; Simons, M.; Wijffelman, C.A.; Lugtenberg, B.J.J.

Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1995**, 17: 221-228

Dunleavy, J.M.

Bacterial, fungal, and viral diseases affecting soybean leaves. Soybean diseases of the North Central Region. Edited by Wyllie, T.D. and Scott, D.H. St. Paul, Minn: American Phytopathological Society, **1988**

Fan, T.W.; Lane, A.N.; Pedler, J.; Crowley, D.; Higashi, R.M.

Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography- mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **1997**, 251 (1): 57-68

Gamliel, A.; Katan, J.

Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathology* **1992**, 82: 328-332

Glick, B.R.

The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1994**, 41: 109-117

Heldt, H.W.

Pflanzenbiochemie, Spektrum Verlag, Heidelberg, 2. Auflage **1999**

Hiltner, L.

Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arb. Dtsch. Landwirtsch.* **1904**, 98: 59-78

Holcenberg, J.S.; Teller, D.C.

Physical properties of antitumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7A. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251 (17): 5375-5380

Huerta-Zepeda, A.; Duran, S.; Du Pont, G.; Calderon, J.

Asparagine degradation in *Rhizobium etli*. *Microbiology* **1996**, 142: 1071-1076

Hüser, A.

Dissertation, Marburg/Lahn, **1999**

Hüser, A.; Klöppner, U.; Röhm K.H.

Cloning, sequence analysis, and expression of the *P. fluorescens* gene (*ansB*) encoding periplasmatic glutaminase/asparaginase. *FEMS Microbiology Letters* **1999**, 178: 327-335

Hylemon, P.B.; Phibbs, P.V.

Independent regulation of hexose catabolizing enzymes and glucose transport activities in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, 48: 1041-1048

Iaccarino, M.; Rossi, M.; Defez, R.; Chiurazi, M.; Manco, G.; Espin, G.; Lamberti, A.; Riccio, A.

- Regulation of nitrogen metabolism in *Rhizobium*. In: *Inorganic nitrogen in plants and microorganisms*. Uptake and metabolism (Ullrich, W.; Rigano, R.; Fugg, A.; Aparico, I., Ed.), **1990**: 234-240
- Imada, A.; Igarasi, S.; Nakahama, K.; Isons, M.
asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* **1973**, 76: 85-99
- James, D.W.; Gutterson, N.I.
Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* Hv37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, 52: 1183-1189
- Janssen, D.B.; Herst, P.M.; Joostem, H.M.L.J.; Van der Drift, C.
Nitrogen control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **1981**, 128: 398-402
- Jones, D.L.; Darrah, P.R.
Influx and efflux of amino acids from *Zea mays* L. roots and their implications for N-nutrition and the rhizosphere. *Plant Soil.* **1993**, 155: 87-90
- Kanamori, K.; Weiss, R.L.; Roberts, J.D.
Ammonia assimilation in *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262 (23): 11038-11045
- Kleeberger, A.; Castorph, H.; Klingmüller, W.
The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to Gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* **1983**, 136: 306-311
- Kloepper, J.W.; Leong, J.; Teintze, M.; Schoth, M.N.
Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* **1980**, 286: 885-886
- Kloepper, J.W.; Zablotowicz, E.M.; Lifshitz, R.
Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, In: *The rhizosphere and plant growth*. (Keister, D.L.; Cregan P.B., Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1991**: 315-326

- Köhler, T.; Shigeaki, H.; Ramos, J.L.; Timmis, K.N.
Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN σ factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.* **1989**, 171: 4326-4333
- Kovalenko, N.A.; Tsvetkova, T.A., and Nikolaev, A.I.
Substrate specificity, inhibitors and kinetics of deamidase AG (asparaginase-glutaminase) from *Pseudomonas fluorescens* AG. *Vopr. Med. Khim.* **1977**, 23 (5): 618-622.
- Kyhse-Anderson, J.
Electroblotting of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1984**, 10: 105-132
- Laemmli, U.K.
Cleavagae of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227: 680-685
- Latour, X.; Corberand, T.; Laguerre, G.; Allard, F.; Lemanceau, P.
The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62: 2449-2456
- Lengeler, J.; Drews, G.; Schlegel, H.G. (eds.)
Biology of the Prokaryotes, Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage **1999**
- Lifshitz, R.; Kloepper, J.W.; Kozlowski, M.; Simonson, C.; Carlson, J.; Tipping, E.M.; Zaleska, I.
Growth promotion of canola (rapseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* **1987**, 33: 390-395
- Lin, M.; You, C.
Root exudates of rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with *Alcaligenes faecalis*. *Sci. Agric. Sin.* **1989**, 22: 6-12
- Loper, J.E.; Buyer, J.S.
Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1991**, 4: 5-13

Lynch, J.M.

Microbial factors in crop productivity. In: *Soil Biotechnology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford **1983**: 191

Lynch, J.M.; Whipps, J.M.

Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **1990**, 121: 1-10

MacGregor, Wolff, J.A.; Arora, S.K.; Hylemon, P.B.; Phibbs, P.V. Jr.

Catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. In: „Pseudomonas: Molecular Biology and Technology“ (Galli, E.; Silver S.; Withold B., eds.), *American Society for Microbiology*, Washington, D.C. **1992**: 198-206

MacGregor, C.H.; Arora, S.K.; Hager, P.W.; Dail, M.B.; Phibbs, P.V. Jr.

The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *pyrE-crc-rph* region and the purification of the *crc* gene product. *J. Bacteriol.* **1996**, 178: 5627-5635

Masters, P.S.; Hong, J.S.

Genetics of the glutamine transport System in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1981**, 147 (3): 805-819

Meers, J.L.; Tempest, D.W.; Brown, C.M.

Glutamine (amide): 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **1970**, 64: 187-194

Meister, A.

Glutamate synthase from *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* *Methods Enzymol.* **1985**, 113: 327-337

Merrick, M.J.

In a class of its own-the RNA polymerase sigma factor σ^{54} . *Molecular Microbiology* **1993**, 10 (5): 903-909

Merrick, M.J. and Edwards, R.A.

Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **1995**: 604-622

Meyer, J.M.; Stadtman, E.R.

Glutamine synthetase of pseudomonads: Some biochemical and physicochemical properties. *J. Bacteriol.* **1981**, 146: 705-712

Miyamoto, K.; Katsuki, H.

Possible physiological roles of aspartase, NAD- and NADP- requiring glutamate dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem.* **1992**, 112 (1): 52-56

Müller, C.; Petruschka, L.; Cuypers, H.; Burchhardt, G., and Herrmann, H.

Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *J. Bacteriol.* **1996**, 178 (7): 2030-2036

Mulya, K.; Watanabe, M.; Goto, M.; Takikawa, Y.; Tsyumu, S.

Suppression of bacterial wilt disease of tomato root dipping with *P. fluorescens* pfG32 - The role of antibiotic substances and siderophore production. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **1996**, 62: 134-140

Nikolaev, A.I.A.; Evseev, L.P.; Tiul'panova, E.S.; Abdumalikov, A.K.H.

Isoenzymes of asparaginase in *Pseudomonas* sp. *Biokhimiia*. **1969**, 34 (2): 352-355

Nikolaev, A.I.A.; Sokolov, N.N.; Mardashev, S.R.

Mechanism of induction of synthesis of asparaginase and glutaminase in *Pseudomonas fluorescens* AG by aspartic and glutamic acids. *Biokhimiia*. **1971**, 36 (3): 643-648

Nikolaev, A.I.; Sokolov, N.N.; Kozlov, E.A., Kutsman, M.E.

Isolation and properties of a homogeneous L-asparaginase preparation from *Pseudomonas fluorescens* AG. *Biokhimiia* **1975**, 40 (5): 984-989

Nyberg, K.; Clarke, P.

Glutamin synthetase activities of cultures of *Pseudomonas aeruginosa* grown in minimal media with histidine, nitrate or ammonium sulphate as the nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, 107: 193-197

O'Farrell, P.H.

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, 250: 4007-4021

O'Sullivan, D.J.; Stephens, P.M.; O'Gara, F.

Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. *Soil Biol. Biochem.* **1991**, 23: 623-627

O'Sullivan D.J.; O'Gara F.

Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **1992**, 56: 662-676

Odham, G.; Tunlid, A.; Valeur, A.; Sundin, P.; White, D.C.

Model system for studies of microbial dynamics at exuding surfaces such as the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, 52: 191-196

Paulitz, T.C.

Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. *Phytopathology* **1991**, 81: 1282-1287

Philipps, A.T.

Glutamic and aspartic acid and their amides. In: *The Bacteria. A treatise on structure and function*. Vol. 10: *The biology of Pseudomonas*. (Sokatch, J.R.; Ornston, L.N., eds.) **1986**: 413-417

Read, D.J.

Mycorrhizas in ecosystems - nature's response to the „law of the medium“. In: *Frontiers in Mycology*, (D.L. Hawksworth, ed.) **1991**: 101-130. Wallingford, CAB International

Renu, S.; Chandrasekaran, M.

Extracellular L-glutaminase production by marine bacteria. *Biotech. Lett.* **1992**, 14 (6): 471-474

Roberts, J.

Purification and properties of a highly potent antitumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7A. *J. Biol. Chem.* **1976**; 251 (7): 2119-2123

Sarniguet, A.; Kraus, J.; Henkels, M.D.; Muehlchen, A.M.; Loper, J.E.

The sigma factor σ_s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92 (26): 12255-12259

Schlegel, H.G.

Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage **1992**

Schreier, H.J.

Biosynthesis of glutamine and glutamate and the assimilation of ammonia. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *Biochemistry, physiology and molecular genetics* (Sonenshein, A.L.; Hoch, I.A. & Losick, R.; eds.), *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., **1993**: 281-298

Schulz, U.M.; Werner, D.

Steigerung des antagonistischen Potentials von *Pseudomonas fluorescens* gegenüber *Pythium ultimum* an Gurken (*Cucumis sativus* L.) durch Flavonoide. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **1998**, 105 (2): 157-167

Shapiro, B.M.; Stadtman, E.R.

Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **1970**, 17A: 910-922

Shepherd, D.; Davies, H.V.

Patterns of short term amino acid accumulation and loss in the root zone of liquid-cultured forage rape. *Plant Soil*. **1994**, 158: 99-109;

Shepherd, D.; Davies, H.V.

Effect of exogenous amino acids, glucose and citric acid on the patterns of short-term accumulation and loss of amino acids in the root zone of sand-cultured forage rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil*. **1994**, 158: 111-118

Shibatani, T.; Kakimoto, T.; Chiabata, I.

Stimulation of L-aspartate- β -decarboxylase formation by L-glutamate in *Pseudomonas dacunhae* and improved production of L-alanine. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 38: 359-364

- Siegel, L.S.; Hylemon, P.B.; Phibbs, P.V. Jr.
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and activities of adenylat cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Pseudomonas* and *Bacteroides*. *J. Bacteriol.* **1977**, 129: 87-96
- Simons, M.; Permentier, H.P.; de Weger, L.A.; Wijffelman, C.A.; Lugtenberg, B.J.J.
Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, 10: 102-106
- Simons, M.; van der Bij, A.J.; Brand, I.; de Weger, L.A.; Wijffelman, C.A., Lugtenberg, B.J.J.
Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1996**, 9: 600-607
- Smyth, P.F.; Clarke, P.H.
Catabolite repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase: the effect of carbon source on amidase synthesis. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, 90 (1): 81-90
- Sokolov, N.N.; Nikolaev, A.I.
Sulphydryl groups of L-asparaginase A from *Pseudomonas fluorescens* AG. *Biokhimiia* **1976**, 41 (4): 727-731
- Sun, D.; Setlow, P.
Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *ansR* gene, which encodes a repressor of the *ans* operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. *J. Bacteriol.* **1993**, 175 (9): 2501-2506
- Thomashow, L.S.; Weller, D.M.
Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **1988**, 170: 3499-3508
- Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Bonsall, R.F.; Pierson, L.S.
Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56: 908-912
- Thomashow, L.S.; Mavrodi, D.V.
The genetics and regulation of antibiotic production of PGPR. In: *Plant Growth*

Promoting Rhizobacteria **1997**: 108-115 (Ogoshi A.; Kobayashi K.; Homma Y.; Kodama F.; Kondo N.; Akino S., eds.)

Thöny, B; Hennecke, H.

The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **1989**, 63: 341-358

Tsuchiya, K.

Current status and future prospects in research and practice of biological control of plant diseases in Japan. In: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* **1997**: 30-35 (Ogoshi A.; Kobayashi K.; Homma Y.; Kodama F.; Kondo N.; Akino S., eds.)

Van de Broek, A.; Vanderleyden, J.

The role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1995**, 8: 800-810

Van Overbeek, L.S.; van Elsas, J.D.

Root exudate-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 61: 890-898

Voisard, C.; Keel, C.; Haas, D.; Defago, G.

Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* **1989**, 8: 351-358

Walshaw, D.L. and Poole, P.S.

The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Molecular Microbiology* **1996**, 21: 1239-1252.

Wenhua, T.; Hetong, Y.

Research and application of biocontrol plant diseases and PGPR in China In: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* **1997**: 2-9 (Ogoshi A.; Kobayashi K.; Homma Y.; Kodama F.; Kondo N.; Akino S., eds.)

Werner, D.; Batinic, T.; Feder, I.S.; Kosch, K.; Redecker, D.; Schulz, U.; Streit, W.; Vinuesa-Fleischmann, P.

Competitiveness of symbiotic and antagonistic soil bacteria - Development of reporter gene fusion and specific gene probes. In: *Plant Growth Promoting*

Rhizobacteria **1997**: 44-48 (Ogoshi A.; Kobayashi K.; Homma Y.; Kodama F.; Kondo N.; Akino S., eds.)

Whipps, J.M.

Carbon economy. In: *The Rhizosphere* (Lynch, J.M., ed.) **1990**: 59-99. John Wiley & Sons, Chichester, UK

Wolff, J.A.; MacGregor, C.H.; Eisenberg, R.C.; Phibbs, P.V. Jr.

Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **1991**, 173 (15): 4700-4706

Worsey, M.J.; Franklin, F.C.H.; Williams, P.A.

Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by TOL plamid (pWW0) from *P. putida* mt-2. *J. Bacteriol.* **1978**, 134: 757-764

Wu, L.; Welker, N.E.

Cloning and characterization of a glutamine transport operon of *Bacillus stearothermophilus* NUB36: Effect of temperature on regulation of transcription. *J. Bacteriol.* **1991**, 173 (15): 4877-4888

Zheng, S.; Haselkorn, R.

A glutamate/glutamine/aspartate/asparagine transport operon in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* **1996**, 20 (5): 1001-1011

Zhang, Y.; Ludden, P.W.; Roberts, G.P.

DNA-sequence of *glnA* from *Rhodospirillum rubrum*. *GenBank DNA sequences* in database *PubMed* of NLM (National library of medicine) **1997**:
<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>